ZELLFORSCHUNG UND ZELLULARTHERAPIE

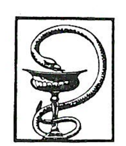
herausgegeben von F. Schmid und J. Stein

ZELLFORSCHUNG UND ZELLULARTHERAPIE

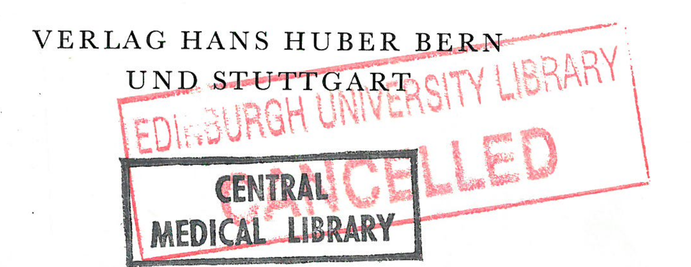
herausgegeben von F. Schmid und J. Stein

unter Mitarbeit von

Privatdozent Dr. G. Andres, Mainz
Prof. Dr. P. Bernhard, Duisburg
Prof. Dr. F. Dittmar, Höxter
Dr. S. Dornbusch, Wiesbaden
Prof. Dr. H. Hoepke, Heidelberg
Prof. Dr. A. Kment, Wien
Dr. W. Krampitz, Rheinhausen
Dr. A. Landsberger, Heidelberg
Privatdozent Dr. K. Neumann, Köln
Prof. Dr. H. G. Rietschel, Herford
Prof. Dr. F. Schmid, Heidelberg
Prof. Dr. H. Schmidt, Bern
Dr. J. Stein, Heidelberg
Prof. Dr. P. Uhlenbruck, Köln
Prof. Dr. A. Valls Conforto, Barcelona



VERLAG HANS HUBER BERN
UND STUTTGART



Mit 163 vorwiegend farbigen Abbildungen

Satz, Druck und Einband: Buchdruckerei Ott Thun
Printed in Switzerland

HERRN PROFESSOR
DR. MED. PAUL NIEHANS
ZUM 80. GEBURTSTAG
GEWIDMET



Inhaltsverzeichnis

Immunologie

Wirkungsspezifität

Revitalisierung

Vorwort

Die Entwicklung von der Zellularpathologie und Zellphysiologie zur Zellulartherapie ist folgerichtig verlaufen. Heute erscheint es verständlich, Zellen und Zellbausteine – und damit wahrscheinlich auch biologische Faktoren – des fetalen oder juvenilen Organismus durch Überpflanzuug einem kranken Organ oder einem alternden Organismus nutzbar zu machen.

Der Schritt von der klassischen Form der operativen Übertragung von Organen oder Organteilen zu der Injektions-Implantation einer Suspension fetaler Zellen (Zellulartherapie) wurde jedoch vielfach a priori abgelehnt. Wie jeder empirisch deduzierten Heilmethode blieb der Zellulartherapie der Vorwurf einer mangelnden theoretischen Fundierung nicht erspart. Es mag Phasen gegeben haben, in denen wegen kritikloser Massenanwendung eine Warnung vor dieser Therapieform angebracht und vielleicht auch nützlich war. Diese bedauerliche Periode ist überwunden. In Grundlagenforschung und klinischer Prüfung ist inzwischen so viel Neues und Wertvolles erarbeitet worden, daß eine Verpflichtung besteht, die Erkenntnisse im Interesse der praktischen Anwendung auszubauen.

Der zur Zeit vorherrschende Einfluß der Chemie und Physik auf die Therapie darf das biologische Denken nicht zu sehr in den Hintergrund drängen. Biologische Stoffe pflanzlicher und tierischer Herkunft sind in der Heilkunde seit ihren Anfängen mit Erfolg angewendet worden. Gerade in einer Zeit, in der chemische Einwirkungen und physikalische Kräfte biologische Substanz in früher kaum vorstellbarem Maß zu gefährden vermögen, sind wir verpflichtet zu versuchen, diese wieder aufzubauen und wenn möglich sogar zu ersetzen.

Zwischen den Vertretern einer nicht fundierten Kritik und einer kritiklosen Anwendung stehend, sieht die Internationale Forschungsgesellschaft für Zellulartherapie ihre Verpflichtung darin, diese neue Therapieform zu erforschen und die Ergebnisse der Fachwelt mitzuteilen. Kliniker verschiedenster Fachrichtungen: Anatomen, Physiologen, Zoologen, Immunologen und Biochemiker haben unter rein wissenschaftlich-experimentellen Kautelen innerhalb der Forschungsgesellschaft Teilfrage um Teilfrage aufgegriffen. Die Ergeb-

nisse wurden vervollständigt durch die neuen Erkenntnisse auf dem Gebiete der immunologischen Toleranz, der Biochemie und der Zellorganellen.

Das vorliegende Buch enthält die vorwiegend experimentell erarbeiteten Grundlagen. Es soll ein Bild vermitteln von der Organisation und Funktionsvielfalt der Zelle und ihrer Organellen, ihrem Gehalt an biologischen Substanzen in frischem und konserviertem Zustand. Das Schicksal körperfremder Zellen im embryonalen, fetalen und adulten Organismus wird vielschichtig dargestellt. Hinsichtlich der therapeutischen Wirkung sind nur objektivierbare, reproduzierbare Versuchsanordnungen ausgewählt worden. Daraus ergab sich das Überwiegen des Tierversuches als Quelle biologischer Therapiestudien gegenüber klinischen Ergebnissen.

Die hier wiedergegebenen Untersuchungsergebnisse können vielleicht Anlaß werden, voreingenommene Meinungen zu revidieren. Für die in der Forschungsgesellschaft zusammenarbeitenden und für die an der Zellulartherapie interessierten Kollegen sei das Buch eine Art orientierende Bilanz, die den Standort aufzeigen und die künftigen Forschungsrichtungen lenken soll.

Was aber soll man einem Werk über eine umstrittene Materie wünschen? Einmal, daß es von seinen Kritikern unvoreingenommen und sachlich gewertet werde, zum anderen, daß Mitarbeiter und Leser sich der Systematik der hier vorliegenden Forschungsergebnisse bewußt werden mögen. Vor allem aber soll dem damit Geehrten das bunte Mosaik der vielen Beiträge aus verschiedenen Wissensrichtungen Freude bereiten.

F. Schmid J. Stein

Heidelberg, November 1962

Einführung

VON PROF. DR. PAUL UHLENBRUCK, KÖLN

Die Therapie mit Zellen oder Zellverbänden ist uralt. Hautüberpflanzungen vom Tier auf den Menschen werden schon von Hippokrates erwähnt. Die Zellulartherapie stammt von dem Schweizer Chirurgen Paul NIEHANS. Er bezeichnete damit die Injektions-Implantation heteroplastischen Materials zu therapeutischen Zwecken. Diese Benennung lehnt sich bewußt an den von VIRCHOW geprägten Begriff der Zellular-Pathologie an.

Die Zellulartherapie ist eine seit Jahrzehnten bewährte Methode, die zu den Verfahren der Organ-Therapie und der Transplantations-Therapie zu rechnen ist. Es ergeben sich somit Parallelen zu ähnlichen Heilmethoden, die nachstehend aufgeführt sein mögen:

Frischdrüsen-Therapie von ZAJIZEK,
Hydrolysate von KASAKOW,
Gewebe-Therapie von FILATOW,
Organimplantationen von DESTUNIS,
Tissular-Therapie von CORDARO oder Placenta-Therapie von BERNHARD,
Immuno-Therapie von BOGOMOLETZ,
Unspezifische Reiz-Therapie mit Eiweißkörpern,
Organextrakt-Therapie (Iloban, Ripason, Campolon, Recosenin, Padutin, Actihaemyl usw.),
Organüberpflanzung (DEMICHOW u. a.),
Regeneresen von DYCKERHOFF (Ribonucleinsäure-Produkt),
Mitochondrien (HÖTZL, LAUDAHN, LETTRÉ).

Die Ansicht, daß die Einverleibung menschlicher oder tierischer Organe aus einem jungen und vitalen Körper eine heilende Wirkung entfaltet, findet sich von Anbeginn in der Geschichte der Heilkunst. STEIN weist darauf hin, daß in einem der ältesten medizinischen Dokumente, die wir kennen, nämlich in dem Papyrus von Ebers, ferner bei Aristoteles und bei dem älteren Plinius eine Reihe von Präparaten genannt werden, die aus tierischen oder menschlichen Organen hergestellt wurden. Paracelsus hat zu Beginn des 16. Jahrhunderts postuliert: Herz heilt Herz, Niere heilt Niere – frei-

lich ohne sich der Tragweite einer solchen Formulierung bewußt zu sein. HUNTER hat 1771 in England und BERTHOLD 1849 in Göttingen bei kastrierten Hähnen die substituierende Wirkung implantierter Hoden untersucht und festgestellt. Bekannter geworden sind die Versuche von Claude BERNARD, 1857, der den Begriff der inneren Sekretion prägte. BROWN-SÉQUARD hat 1889 sich selbst Hundehodenextrakt injiziert, was allerdings nur vorübergehende Wirkung hatte. Die chirurgische Übertragung innersekretorischer Drüsen wurde von VORONOFF durchgeführt durch Implantation von Affenhoden auf alternde Männer.

Die Versuche von STEINACH mit der Ligatur der vasa deferentia sind allgemein bekannt. Hypophysenüberpflanzungen sind sehr häufig vorgenommen worden. FELLINGER in Wien berichtet über 9000 Hypophysenüberpflanzungen.

Im Grunde genommen ist die Injektions-Implantation nicht wesentlich verschieden von der chirurgischen Implantation, sondern eben nur eine andere Verfahrensart. Die Technik der Injektions-Transplantation wurde wohl erstmalig von dem Breslauer Chirurgen KÜTTNER mitgeteilt, geriet aber wieder in Vergessenheit. 1929 hat KÜTTNER sich noch einmal zu diesem Problem geäußert und beschrieb eine spezielle Injektionsspritze zur Injektions-Transplantation endokriner Drüsen. 1927 haben KURTZAHN und HÜBENER über Schilddrüsenüberpflanzung durch Injektionen bei der Behandlung myxödematöser Kinder berichtet.

Wenn wir das Blut zu den übertragbaren Organen rechnen, so ist der Gedanke, mit frischem Blut zu verjüngen, ebenfalls uralt.

Eine Stelle aus dem VII. Buche der Metamorphosen des Ovid schildert, wie Medea, die Zauberin aus Colchis, ihren Schwiegervater Anchises (Aeson) mit Hilfe von frischem Blut verjüngt habe. Das alte Blut habe sie vorher abgelassen. An der betreffenden Stelle der Dichtung heißt es:

«Quid nunc dubitatis inertes
Stringite gladios veteremque haurite cruorem
Ut repleam vacuas juvenili sanguinis venas!»

Medea soll, wie ein Schriftsteller des Mittelalters, Claus Borrichius, behauptete, die Verjüngung durch Übertragung von frischem, jugendlichem Blut von ägyptischen Priestern gelernt haben.

Der noch im 18. und 19. Jahrhundert für die Transfusion gebräuchliche Name «Medeas Curmethode» (cura medeae) ist auf Ovids Dichtung zurückzuführen. Auch bei Hippokrates finden wir Hinweise, Blut als Mittel zur Krankenbehandlung zu verwenden. Ausgehend von der Vorstellung, daß die Krankheit auf einer schlechten Blutmischung beruhe, empfiehlt er als Heilmittel gegen Fallsucht das Bluttrinken. Vierhundert Jahre später äußern Plinius Secundus (23–79 n. Chr.) und Aulus Cornelius Celsus (um 50 n. Chr.) die gleiche Auffassung.

Wenn wir die Bluttransfusion in das sehr interessante Verfahren der Übertragung fremder Zellen auf einen Organismus einbeziehen, so wäre der erste Beginn der Zellulartherapie in das Jahr 1667 zu verlegen, als Jean BAPTISTE DENIS Blut vom Hammel auf den Menschen übertrug. Man bedenke, was damals ein solcher Eingriff bedeutete. Es bedurfte Jahrhunderte der immunbiologischen Forschung, um aus diesen mißglückten Versuchen den heutigen komplizierten Apparat der Blut-Austauschtransfusion oder etwa der Bluttransfusion bei den Herzoperationen auszubauen.

Ähnlich wie die Bluttransfusion wurde auch die Transfusion von Knochenmarkzellen erst in neuerer Zeit ausgebaut. Sie ist die jüngste Form der Übertragung von heterologen Zellen auf einen Organismus.

Hier öffnen sich neue Wege der Behandlung von Blutschäden nach Röntgenbestrahlung oder nach cytostatischen Mitteln. Eine Reihe von Veröffentlichungen von HENNING und WITTE in Erlangen, von FLEISCHHACKER in Wien, von RIETSCHEL in Herford, von KLEINSORGE in Jena liegen mit mehr oder weniger positiven Resultaten vor.

Kehren wir von diesen geschichtlichen Überblicken und Ausblicken zu der NIEHANSschen Zellulartherapie zurück, so gehen die NIEHANSschen Gedankengänge aus von den Experimenten von CARELL an Zellkulturen, die NIEHANS zu der Überzeugung brachten, daß den fetalen Zellen eine besondere Wirkung zukommen müsse. NIEHANS versuchte 1927 eine Therapie, die er damals als Tissular-Transplantation bezeichnete, und injizierte die eosinophile Zellschicht des Hypophysenvorderlappens von Kälbern einem jugendlichen menschlichen Zwerg.

Er erreichte dadurch ein Längenwachstum von 32 cm. 1931 wurde Nebenschilddrüsenbrei einer moribunden Patientin mit

schwerer Tetanie injiziert mit einem schlagartigen Effekt. Es folgten später Versuche mit Zellkulturen.

1949 macht Paul NIEHANS einen Selbstversuch mit eisgekühlten Zellen.

1949 wurden erstmalig von ihm durch Gefriertrocknung konservierte fetale Zellen verwandt.

Seit 1960 datieren die Versuche mit Einspritzungen von B-Zellen der Langerhansschen Inseln bei Diabetes mellitus.

Von HÖTZL und LAUDAHN (Berlin) wurden die Mitochondrien als therapeutisches Agens besonders herausgestellt in Übereinstimmung mit früheren Versuchen von LETTRÉ (Heidelberg), der ebenfalls den Mitochondrien einen wesentlichen Teil der Wirkung zuschreibt. LETTRÉ konnte durch Verwendung von radioaktiven, phosphormarkierten Zellbestandteilen den Übergang des markierten Materials in die korrespondierenden Zellen des Empfängertieres nachweisen. Durch diese und andere Untersuchungen zum Beispiel von ANDRES (Chicago-Mainz) an der geschädigten Leber läßt sich immerhin die Beobachtung wesentlich stützen, daß injizierte Zellen zu einem gewissen Grade die Eigenschaft haben, ihr Zellmaterial den im Organismus zugrunde gegangenen oder geschädigten Zellen zur Verfügung zu stellen. Auch spricht dies für die NIEHANSsche Konzeption einer regenerierenden Wirkung von implantiertem Zellmaterial. Allerdings ist eine echte Regeneration nur beim Bindegewebe und bei den Epithelien möglich.

RIETSCHEL (Herford) hat 1955 als Gegensatz zur echten anatomischen Regeneration den Begriff einer funktionellen Regeneration eingeführt. Das heißt, es solle ohne anatomisch faßbare Veränderungen der Zelle eine funktionelle Verbesserung ihrer Tätigkeit als möglich angesehen werden.

Von DYCKERHOFF (Köln a. Rh.) wird auf Grund von Arbeiten mit der Isotopen-Methode nachgewiesen, daß auch in einer scheinbar ruhenden Zelle noch ständig chemische Austauschprozesse stattfinden. DYCKERHOFF bezeichnet das als molekulare Regeneration.

Die Frage, ob die Wirkung spezifisch oder unspezifisch ist, bleibt ein Zankapfel, aber sie ist berechtigt. Die Auffassung, daß man eine solche Frage nicht zu stellen brauche, weil die Wirkung der Zellulartherapie eben nur eine magische und nicht eine tatsächliche sei, ist durch die Tierversuche in den letzten Jahren mit Sicherheit wi-

derlegt. Ich erinnere hier an schon alte Versuche von Dittmar (Höxter) über das Wachstum von Mäusen nach Zellinjektionen, an die Untersuchungen von Neumann (Köln a. Rh.), der signifikante Unterschiede in Gewicht und Größe verschiedener Organe nach Injektion bestimmter Zellen fand, an die Untersuchungen von Kleinsorge und Dornbusch (Jena) über die Atheromatose des Kaninchens (Hemmung der Atheromatoseentwicklung durch Placenta), an die Untersuchungen von F. Schmid (Heidelberg) über die Beeinflussung des Blutbildes unter Einwirkung der Zellulartherapie, an die Untersuchungen von Kment (Wien) über die Jodspeicherung der Schilddrüse nach Trockenzellinjektionen bei Meerschweinchen. Nach den Untersuchungen von Möse (Graz) läßt sich durch lyophilisierte Organzellen oder Organextrakte der Titer der Heterohämagglutination im Tierversuch mit einer sehr eindrucksvollen Signifikanz steigern.

Auf dem Therapie-Kongreß 1960 in Karlsruhe berichtete Kment über die Alterung der Kollagen-Substanzen bei Ratten und Prüfung der Thermokontraktion von Sehnenfäden des Schwanzes alternder Ratten. Es fand sich mit einer klaren Signifikanz, daß die Verkürzung der Sehnenfäden in der Gruppe, die mit Placenta- oder Hodenaufbereitungen behandelt wurde, wesentlich geringer war als in der Kontrollgruppe. Bei Untersuchungen in der Warburgschen Apparatur ließ sich die Gewebeatmung eindeutig durch Zellaufschwemmungen oder Trockenzell-Präparate verstärken. Auch die Absterberate der Versuchsratten änderte sich nach Zellulartherapie, und die Versuche an Ratten im Labyrinth unter Berücksichtigung der Fehlerzahl und Leistungszeit machen das eindeutig, was wir heute noch unter dem schwer zu definierenden Begriff der Revitalisierung verstehen.

In neueren Versuchen von E. Aehnelt (Hannover) ergaben sich sehr gut fundierte Wirkungen der Zellulartherapie bei Fortpflanzungsstörungen der Großtiere. Klinische Untersuchungen beim Menschen liegen in dieser Richtung vor von Camerer (Wertheim). Auch die Beobachtungen von Haubold (München) über die Wirkung von Organextrakten bei kindlichen Entwicklungsstörungen sind sicher beachtenswert. Haubold geht nicht von der Voraussetzung aus, daß man eine Chromosomen-Mißbildung durch Zellulartherapie heilen könne, wohl aber von der Meinung, daß der

therapeutische Nihilismus nichts erreicht habe und daß eine Entwicklungsförderung durch Zellulartherapie mit entsprechender ärztlicher Führung unter Umständen sehr erheblich mehr erreichen könne.

Zur objektiven Untermauerung der Zellulartherapie sind die Versuche von WRBA (München) von Interesse, der durch Zusatz bestimmter mit Radioisotopen markierter Zellaufschwemmungen streng organ-spezifische Steigerungen des Stoffwechsels bei Gewebskulturen nachweisen konnte. H. KALB (München) fand eine stoffwechselsteigernde Wirkung bestimmter Seren auf den Herzmuskel (Organkulturen, Explantate von Rattenherzen). KUHN und KNÜCHEL (Heidelberg) konnten bei klinischen Versuchen durch die Bestimmung drüsentypischer Harnsteroidfraktionen den Nachweis der organspezifischen Wirkung parenteral injizierter Trockenzellen erbringen.

Bei Behandlung von Carcinomen mit cytostatischen Mitteln tritt häufig eine Blutschädigung ein, die sich durch zellular-therapeutische Maßnahmen stoppen läßt (RIETSCHEL 1960). Natürlich ist das keine Tumortherapie, es bedeutet aber eine Lebensverlängerung für den Patienten. Auch aus der Erlanger Klinik liegen von HENNING und WITTE und aus der Wiener Klinik von FLEISCHHACKER interessante Beobachtungen vor, durch Zellinjektionen die Bestrahlungsdosen und bei Tumorkranken in inoperablen Fällen die Mengen cytostatischer Mittel erheblich erhöhen zu können.

Auf dem Gebiet der Hämatologie ist hinsichtlich der Therapie mit Knochenmarktransfusionen alles noch im Fluß. Immerhin hat der Fall der jugoslawischen Forscher, die einem Atomunfall zum Opfer fielen (in Vinca/Jugoslawien am 15. August 1958) und die in der Curie-Stiftung in Paris behandelt wurden, gezeigt, daß mit massiven Dosen von Knochenmarkzellen von Spendern gleicher Blutgruppentypen bei intravenöser Injektion (180 bis 300 ccm Knochenmark) ein hervorragender Erfolg und wahrscheinlich eine Lebensrettung erzielt werden konnte (SALMON, MATHÉ, Paris). Hier taucht das große Problem der Totalschädigung des immunbiologischen Abwehrapparates auf, bei dem dann praktisch keine allergischen Reaktionen mehr zu befürchten sind und die massive Übertragung von Zellen, Zellbrei oder Organteilen möglich wäre. Es würde zu weit gehen, auf die Vorarbeiten hinzuweisen, die in dem

Referat von J. STEIN (Heidelberg) in Karlsruhe 1961 vorgetragen wurden. Immerhin berühren diese Probleme eng den Gesamtkomplex der Therapie mit Zellen und Zellverbänden.

Daß zahlreiche Kliniken, so die Schultensche Klinik in Köln nach den Untersuchungen von KANZOW, die Martinische Klinik in Bonn nach den Untersuchungen von VORLAENDER und die Bennholdsche Klinik in Tübingen, die Zellulartherapie ablehnen, ist nicht verwunderlich und dürfte recht verschiedene Ursachen haben:

Ungenügende wissenschaftliche Begründung der Zellulartherapie seitens ihrer Inauguratoren und laienhafte publizistische Reklame – merkantile Ausnutzung angeblicher zellular-therapeutischer Erfolge – fehlende Grundlagenforschung – Gefahr der Übertragung von Krankheiten – Gefahr der unberechenbaren allergischen Reaktionen – mangelnde Feststellbarkeit des Erfolges durch die lange Latenzzeit der Therapie – Unmöglichkeit der Durchführung eines doppelten Blindversuches, weil kein geeignetes Placebo-Präparat vorhanden ist – unerlaubte und sinnlose Ausweitung der Indikationen der Zellulartherapie auf nicht behandelbare Krankheiten – subjektiv vorgefaßte Meinungen – mangelnde Begründung im Tierexperiment – Unbehagen bei der Injektion einer nach Menge und Wirkung nicht kontrollierbaren Zellsuspension, die eine exakte Dosierung ausschließt. Auf die letzte Tatsache hat GORDONOFF (Bern) noch vor kurzem hingewiesen, der insgesamt durchaus positive experimentelle Beiträge zur Frage der Zellulartherapie liefert.

Man darf bei dem heutigen Stand der Dinge sagen, daß die Welle, die Paul NIEHANS hervorgerufen hat, noch keineswegs verebbt ist, sondern daß man immer mehr erkennt, welche Fülle von immun-biologischen Problemen damit aufgeworfen worden ist. Das Wort von LETTRÉ, daß zu deren Erforschung Jahrzehnte nötig sein werden, hat wahrscheinlich heute noch dieselbe Berechtigung, die es 1954 hatte, obwohl wir nicht verkennen wollen, daß in der Grundlagenforschung seither sehr gute und solide Arbeit geleistet wurde.

Die Zellulartherapie ist keine Magie, sondern ein noch nicht gelöstes immunbiologisches Problem. Es ist die Tragik der Zellulartherapie, daß sie einen therapeutischen Siegeslauf begann auf Grund reiner Empirie – sicher nicht ohne Erfolg, sicher aber auch

nicht ohne Mißerfolg. Es ist müßig zu fragen, ob es besser gewesen wäre, die Zellulartherapie erst in ihren Grundlagen aus der Immuntherapie heraus zu entwickeln – das, was heute von ernsthaften Forschern versucht wird.

Man kann den Weg dieser Therapie bedauern, aber man kann sie deshalb nicht in Bausch und Bogen ablehnen, sondern sollte ihre Grundlagen erforschen. Das ist zu einem Teil schon geschehen und die Ergebnisse werden in diesem Buch zusammengefaßt.

Es soll schließlich nicht unerwähnt bleiben, daß einer der besten deutschen Immunbiologen, Hans SCHMIDT, Marburg, bereits 1954 das Vorwort zu dem ersten von NIEHANS veröffentlichten Buch über Zellulartherapie geschrieben hat und sich auch an diesem Buch mit einem Beitrag beteiligte. Ferner hat 1961, nach vielen Jahren des oft so nutzlosen Streitens, einer der bekanntesten amerikanischen Biologen, Paul WEISS, den Ausspruch getan, er könne es sich nicht leisten, sich nicht um die Zellulartherapie zu kümmern.

Die Zellulartherapie beinhaltet noch viele Fragen, die der Erforschung und Klärung harren.

Allgemeine Grundlagen



Allgemeines über Zellstrukturen und ihre Funktionen

VON PROF. DR. A. KMENT, WIEN

Die Zelle als kleinste Lebenseinheit ist in der Lage, unbelebtes Material in ihr Inneres aufzunehmen und aus diesen Stoffen ihren Bau- und Betriebsstoffwechsel zu bestreiten. Der Ablauf der Lebensvorgänge der Zelle folgt physikalisch-chemischen Gesetzen, ihre Erforschung wieder bedient sich physikalisch-chemischer Methoden. Einblick in die Lebensvorgänge der Zelle ist in befriedigendem Maße nur dann zu erhalten, wenn sich die Forschung vorerst dem Studium von Einzelstrukturen und Teilfunktionen der tragenden Lebenseinheit im Sinne der exakten Naturwissenschaften widmet. Die vertiefte Erkenntnis der Teilfunktionen wird in zunehmendem Maß das Verständnis der Lebenserscheinungen der Zelle selbst sowie des Gesamtorganismus ermöglichen. Aus diesen Gegebenheiten bemüht man sich in den letzten Jahren immer mehr, die strukturellen und dynamischen Funktionseinheiten der Zelle zu ergründen, um die Lebensgrundlagen und die Lebensäußerungen, auch der vielzelligen Organismen, aus den allgemeinen Lebensvorgängen der Einzelzelle abzuleiten und zu verstehen.

Die moderne Zellforschung benützt die verschiedensten Forschungsmethoden zur Erreichung ihrer Ziele, die entscheidenden Schritte über die klassische Cytologie hinaus sind getan. Verwendung finden vor allem Methoden der organischen und physikalischen Chemie, der Kolloid-, Bio-, Enzym- und Histochemie, der Röntgenanalyse, der Polarisations-, Fluoreszenz-, UV- und Elektronenmikroskopie, der Absorptionsspektroskopie, Autoradiographie, Isotopenforschung, Entwicklungsphysiologie, experimentellen Genetik, Virusforschung und weiterer Zweige der Naturwissenschaften und Medizin. Die Ergebnisse dieser verschiedenen Forschungsrichtungen lassen erkennen, daß alle Lebensäußerungen der Zelle an bestimmte Zellstrukturen gebunden sind und somit Funktionen und Feinbau der Zelle unlösbar zusammengehören. Weiter zeigt sich, daß alle tierischen Zellen nach dem gleichen Grundplan gebaut sind, die gleichen Zellstrukturen besitzen und dieselben Grundfunktionen aufweisen. Erst dieses Allgemeine in Struktur und Funktion der Einzelzelle gab und gibt die Basis der Entwicklungs-

möglichkeiten der lebenden Substanz zu Geweben, Organen und Organismen, mit den dazugehörenden Spezialstrukturen und Spezialfunktionen. In vorliegendem Kapitel soll in aller Kürze und in allgemeiner Form über das Wesentliche der Zellstrukturen und ihre Funktionen berichtet werden. In die Betrachtung einbezogen sind:

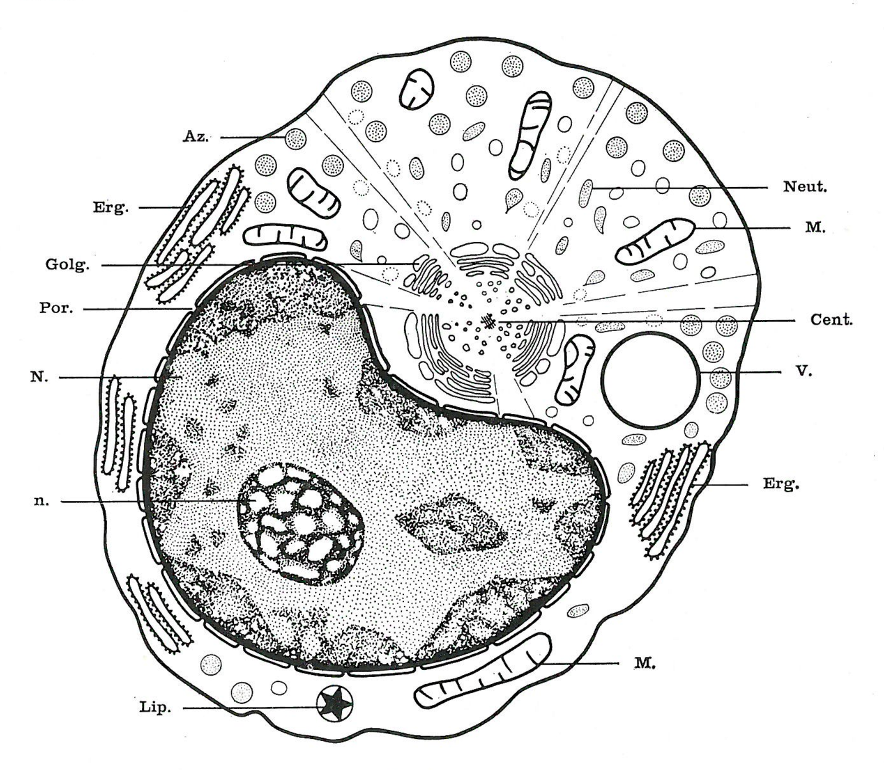


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Anordnung der Zellorganellen

In diesem neutrophilen Myelocyten sind der Kern (N.), die Nucleolen (n.) und die Kernmembran mit ihren Poren (Por.) zu erkennen. In der Mitte der Zelle befindet sich das Centrosom, dessen Mittelpunkt die Centriolen (Cent.) bilden. Die Peripherie des Centrosoms wird vom Golgi-Apparat (Golg.) gebildet. Die die Asterfigur bildenden Strahlen scheinen aus dem Centrosom zu kommen. Im Cytoplasma befinden sich Mitochondrien (M.), unreife azurophile (Az.) und reife neutrophile (Neut.) Granula, eine kontraktile Vacuole (V.), eine lipoide Vacuole (Lip.) sowie Säcke des endoplasmatischen Reticulums, umgeben von Paladeschen Granula (Erg.).
Aus: M. Bessis «Die Zelle im Elektronenmikroskop», Sandoz-Monographie, 1960.

a) Zellmembran, b) Grundplasma, c) Zellkern, d) Endoplasmatisches Reticulum, e) Mitochondrien, f) Mikrosomen, g) Zentralkörperchen, h) Golgi-Apparat, i) Vacuolen (Abb. 1). Als Grundlage der Bearbeitung dienten vor allem die Veröffentlichungen folgender Autoren: Bessis (1960), Brachet und Mirsky (1961), Felix (1959), Goodwin und Lindberg (1961), Haas (1955), Horstmann und Knopp (1957), Klug (1961), Kühn (1955), Lang und Siebert (1954), Langley (1961), Netter (1959), Perutz (1958), Porter und Palade (1957), Robertson (1959), Schriefers (1961), Sirlin (1960), Stich (1956), Thiel (1959) und Weißenfels (1958).

a) *Zellmembran*

Die Verwendung des Elektronenmikroskops hat eindeutig bewiesen, daß die tierische Zelle eine Membran in der Dicke von etwa 70 Å besitzt. Wenn auch der strukturelle Aufbau in allen Einzelheiten noch nicht erkannt ist, ergibt sich dennoch das Vorliegen zweier osmiophiler Außenschichten (etwa 20 Å), vorwiegend aus Lipoiden bestehend, und einer osmiophoben Innenschicht (etwa 30 Å) aus Proteinen. Die Oberflächen der Lipoidlamellen scheinen Mucoproteide zu enthalten. Die Elektronenmikroskopie erweiterte unser Wissen über die Oberfläche der Zelle auch in der Richtung, daß viele Zellen zahlreiche Fortsätze und Einbuchtungen besitzen. So finden sich vor allem bei Nieren- und Darmepithelzellen dicht gelagerte dünne (etwa 0,1 μ) und lange (etwa 1–3 μ) Cytoplasmafortsätze. Bei Epithelzellen existieren vorwiegend an den Berührungsflächen ineinandergreifende Aus- und Einbuchtungen zur Verfestigung der Epithelzellverbände. An den freien Zelloberflächen, die mit Blut oder Gewebsflüssigkeit in Kontakt stehen, beobachtet man vielfach «Mikro-Zotten» (0,1–0,2 μ lang, 500 Å dick). Die Zelloberfläche kann aber auch verschieden tiefe Einbuchtungen (geschlängelt oder labyrinthartig) aufweisen. Es wird angenommen, daß diese Einstülpungen zur Aufnahme von Molekülen aus der Zellumgebung dienen.

Die Zellmembran besitzt kolloidale Eigenschaften, sie weist eine beachtliche Konsistenz auf und kann verhältnismäßig leicht aus dem Gel- in den Solzustand übergehen. Die Konsistenz dieses Grenzgebietes wird durch K-Ionen vermindert, dagegen durch Ca- und Mg-Ionen hinaufgesetzt. Die Elastizität und Oberflächenspan-

nung der Zelle hängen eng mit dem Zustand der Zellmembran zusammen, ebenso dürfte eine autonome Kontraktilität der Zellmembran bestehen. Beobachtungen in der Zellkultur und die Vorgänge bei der Zellteilung bekräftigen diese Ansicht. Experimentell konnten durch Injektionen von ATP Kontraktionen der Zelloberfläche ausgelöst werden. Zellstoffwechsel, Zelloberfläche und Zellform hängen eng zusammen. Denn nur dann kann die kennzeichnende Zellgestalt beibehalten werden, wenn der Zellmembran genügend Energie für die Aufrechterhaltung ihrer Struktur zur Verfügung gestellt wird. Weiter liegen viele Hinweise für das Vorhandensein von Enzymen in der Zellmembran vor, von denen besonders Phosphatasen und Phosphorylasen großes Interesse gefunden haben. Die Zellmembran ist schließlich engstens mit den Prozessen der Permeabilität verbunden.

Probleme des zellularen Stofftransportes hängen aufs engste mit dem Aufbau und der Struktur der Zellmembranen zusammen. Die lebende Zelle zeichnet sich unter anderem dadurch aus, daß sie in der Lage ist, durch Schaffung und Aufrechterhaltung von Trennwänden und Phasengrenzen eine, der jeweiligen Zelle entsprechende Zusammensetzung des Zellinneren zu ermöglichen. Nur in einem solchen milieu intérieur kann ein geregelter Ablauf der enzymatisch-strukturell gekoppelten energetischen Prozesse vor sich gehen. Der stofflichen Trennung der Zelle von ihrer Umgebung, aber auch Trennungen im Zellinnern, dienen Strukturen und Prozesse, die unter dem Begriff Permeabilität bekannt sind. Die Resultate der verschiedenen Forschungszweige ergeben, daß «das Geschehen an den Zellmembranen» (Permeabilitätsänderungen) ein wesentliches und entscheidendes Moment im Lebensprozeß (Zellteilung, Wachstum, Phagocytose, Pinocytose, Erregungsbildung und Erregungsleitung) ist.

Die «stoffliche Selektion» ist eine der vornehmsten Aufgaben der Zellorganisation, die Mechanismen hierzu finden sich allgemein in den Zellmembranen. Diese zeigen sich als wohldurchstrukturierte, schichtenförmige Gebilde von sehr auffallender Gleichförmigkeit ihres Aussehens und des Durchmessers. Im Aufbau spricht man von «Schichten»-(Lipoide) und «Mosaik»-(Proteine) Struktur. Elektronenoptisch erkennt man bei Plasmamembranen eine klare, gleichförmige Membran von 70–80 Å Dicke. Der Grundplan

der Plasmamembran kann durch Abwandlungen des molekularen Aufbaues die besonderen Aufgaben erfüllen helfen. So wurde auf die Möglichkeiten der verschiedenen Dichte und Anordnung der Paraffinreste, die räumliche Verteilung der kationischen Stickstoffreste und der Phosphationen oder die Art der Proteine und schließlich die Enzyme dieser Grenzschichten hingewiesen. Untersuchungen der Membranwiderstände gegen Wechselströme und Berechnungen der Kapazitäten zeigen, daß diese bei Zellen vielfach zwischen 0,6–1,5 μ Farad pro cm² liegen, und aus der auffallenden Übereinstimmung der Werte bei verschiedenen tierischen Zellen ist die Annahme eines im Prinzip gleichen Grundaufbaues der Zellmembranen berechtigt.

Schon Höber hat bei Untersuchungen der Zelldurchlässigkeit zwischen einer «physikalischen» und einer «physiologischen» Permeabilität unterschieden. Bei der «physikalischen» Permeierung von Substanzen handelt es sich um passive Prozesse, bei der «physiologischen» Durchdringung einer Membranstruktur um aktive Stoffbewegungen, die unter Verbrauch von Energie aus dem Zellstoffwechsel erfolgen. Die Richtung des Stofftransportes geht dabei gegen den Gradienten des chemischen und elektrischen Potentials. Die Selektivität biologischer Membranen ist ein dynamischer Prozeß, an dessen Zustandekommen und Durchführung energieliefernde Mechanismen beteiligt sind. Es hat sich weiter gezeigt, daß «grundsätzlich alle Stoffe transportiert» werden können und die selektive Permeabilität und Strukturstabilität der Zelle durch die Bewegung der Elektrolyte mitbestimmt wird. Die Erregungsbildung und Erregungsleitung hängen damit aufs engste zusammen. Die sekretorischen und exkretorischen Leistungen der Zelle bauen sich auf dem zellularen Transport von Wasser, Proteinen, Kohlehydraten und Fetten auf.

Im Rahmen des Permeabilitätsproblems biologischer Membranen wurde ebenfalls untersucht, ob die Stoffwechselenergie nicht auch «zur Bildung und Lösung von Komplexverbindungen» für den Transport durch Zellmembranen Verwendung findet (Carrier-Hypothese). Dabei wurde zwischen Carrier der Membran und des Cytoplasmas unterschieden. Die Einführung des Begriffes Carrier in den aktiven Stofftransport ist zwangsläufig mit dem Vorhandensein von Enzymen an oder in den zu passierenden Membra-

nen gekoppelt. Es kann heute noch nicht entschieden werden, ob eine bestimmte Anordnung von Proteinen in der Membranstruktur selbst die benötigten katalytischen Funktionen erfüllt oder ob es allein bekannte Enzyme sind. Die ursprüngliche Carrier-Idee wurde schließlich durch die Einbeziehung der energetischen Koppelung von reversiblen Redoxsystemen erweitert, bei der sehr geringe Energiemengen verbraucht werden. Eine Vereinfachung haben die verschiedenen Carrier-Hypothesen in der Richtung erfahren, daß man bei Überlegungen über den selektiven Na-Transport und dessen Berechnungen zu der Ansicht kam, dafür würde allein eine Mosaikmembran mit bestimmten Porengrößen negativen und positiven Charakters genügen. Eine weitere Transportmöglichkeit wird auch in Zustandsänderungen von Eiweißkörpern gesehen. Dies wäre so vorstellbar, daß die Proteine einer Membran auf beiden Seiten nicht im gleichen Zustand vorliegen und ein unterschiedliches Bindungsvermögen Substanzen gegenüber besitzen. Allein schon, ob gestreckt oder gefaltet, schafft verschiedene Adsorptionsmöglichkeiten.

Bei kontraktilen Proteinen könnte die Anwesenheit von ATP auf einer Membranseite eine Rolle spielen. Die Permeasen als eiweißartige Unterstützungsstoffe der Permeation sind ein weiterer Hinweis, daß Eiweißkörper in der Lage sind, besondere Aufgaben beim Stofftransport durch biologische Membranen zu übernehmen und altbekannt ist schon die Fähigkeit von Proteinen, die Aufnahme mancher Stoffe (Trypanblau an Albumin, J^{131} an Insulin usw.) in Zellen oder Zellorganellen zu ermöglichen oder zu erleichtern. Die Zellmembranen sind voll und ganz in das dynamische Geschehen des Zellebens eingebaut.

b) *Grundplasma (Grundcytoplasma)*

Entnimmt man einer Zelle ihre Organellen (Nucleus, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Centrosom, Mikrosomen, Ergastoplasma), so bleibt das Grundplasma, das aus einer festeren Schicht, dem Plasmagel (Ektoplasma) und einer flüssigeren, dem Plasmasol (Endoplasma) besteht. Die reversible Sol-Gel-Umwandlung ist ein physiologischer Prozeß; wir finden daher in allen Zellen solche verschiedene Zustandsformen des Plasmas nebeneinander. Das Plasmasol besteht aus Protein-Makromolekeln und Lipiden in einer

wäßrigen Phase. Durch Parallellagerung von Polypeptidketten, unter Benützung der solchen Makromolekeln innewohnenden Haupt- und Nebenvalenzen, kommt es zum Aufbau größerer Struktureinheiten, den sogenannten Elementarfibrillen. Diese können Netzstrukturen oder lichtmikroskopisch erkennbare Fibrillen (Dicke 1–10 μ) bilden, wobei physikalisch-chemischen Vorgängen entscheidende Bedeutung zukommt. Weite Anerkennung für diese Prozesse hat die von FREY-WYSSLING entwickelte Haftpunkttheorie gefunden. Es besteht heute kein Zweifel über den Aufbau des Grundcytoplasmas aus submikroskopischen Elementarfibrillen. Des gleichen Grundprozesses und Grundprinzipes bedient sich die Zelle bei der Erstellung der verschiedensten Filme und Membranen. Gerade die Erforschung des Grundbauplans der tierischen Membranen und ihre Verwendung als Zellstrukturen oder Strukturanteile haben der Zellphysiologie wesentliche Erkenntnisse gebracht.

Das Cytoplasma ist an der Proteinsynthese beteiligt. Im partikelfreien Grundplasma von Rattenlebern findet sich ein Enzymsystem, das in der Lage ist, Aminosäuren in eine reaktionsfähigere Form überzuführen; die dazu benötigte Energie wird von der ATP bezogen. Eine weitere Reaktionsstufe ist die Übertragung dieser aktivierten Aminosäuren auf eine sRNS (soluble RNS) des Grundcytoplasmas. Die beiden hier skizzierten Reaktionen werden durch das sogenannte ph 5,0-Enzym katalysiert. Das für die Übertragung auf die Mikrosomen zuständige Enzym konnte sogar vom ph 5,0-Enzym getrennt werden. Das Cytoplasma jeder Zelle scheint eine ganze Reihe solcher soluble-RNS zu besitzen, die jede in spezifischer Weise die ihr zugehörige Aminosäure terminal zu binden vermag. Die spezifischen Akzeptoren für die Aminosäuren Valin und Tyrosin konnten mit Hilfe modernster Verfahren (Gegenstromverteilung, Chromatographie) gewonnen werden.

Die an die sRNS des Cytoplasmas gebundenen Aminosäuren werden durch Guanosintriphosphat schließlich auf die RNS der Mikrosomen übertragen. Es ergibt sich also, daß die sRNS des Cytoplasmas nur als Zwischenstationen für den Aminosäurentransport zu den Mikrosomen fungieren. Die Versuche in vitro und in vivo bestätigen dies. Radioaktiv gekennzeichnete Aminosäuren finden sich nach der Injizierung zuerst in der sRNS des Cytoplasmas und erreichen erst von dort aus ihre benachbarten Mikrosomen.

Die Steuerung der Zellstoffwechselprozesse kann nur bei Berücksichtigung der Feinstrukturen der Zellorganellen halbwegs richtig verstanden werden. Erst diese enge Verknüpfung erlaubt den Aufbau von chemischen Reaktionsketten und Stoffzyklen zu Funktionskreisen der einzelnen Zelle, der Gewebe und des Makroorganismus.

c) Zellkern (Kernstrukturen)

Wir finden in allen Zellen der Säugetiere (mit Ausnahme der Erythrocyten) einen Kern. Es gibt aber auch Zellen, in denen zwei (Leber) oder mehrere (sogenannte Riesenzellen) Kerne angetroffen werden können. Die Größe und Form des Kernes ist von der Tierart, dem Gewebe und dem Funktionszustand der Zelle abhängig. Durchschnittlich sind die Kerne tätiger Zellen größer als die ruhender. Meistens ist der Zellkern oval oder kugelförmig, die Kerne der Granulocyten aber zeigen, je nach Alter, eine davon stark abweichende Gestalt, wobei, beim weiblichen Geschlecht vor allem, die polymorphkernigen Neutrophilen in hohem Prozentsatz stärker färbbare Kernanhängsel (Barrsche Körperchen) zeigen können. Der Kern kann innerhalb der Zelle die verschiedensten Lagen einnehmen, am häufigsten findet er sich im Zentrum. Wir unterscheiden an ihm die Kernmembran, die Kernkörperchen (Nucleolus), das Nucleoplasma (Karyolymphe) und das Chromatin.

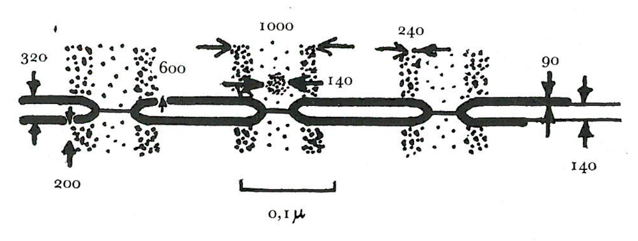


Abbildung 2
(aus Brachet, J. und Mirsky, A. E., 1961)

Die Kernmembran (Abb. 2) besteht aus einer osmiophilen Doppelmembran von je etwa 70 Å Dicke und einer eingeschlossenen osmiophoben Zwischenschicht von etwa 120 Å Durchmesser. Eiweiß- und Lipoidlamellen geben das Hauptgerüst ab. Elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen außerhalb der Kernmembran noch eine zweite äußerst zarte Membran cytoplasmatischen

Baues erkennen, so daß ein schmaler perinuclearer Raum vorliegt, der Verbindung zu den Hohlräumen des endoplasmatischen Reticulums hat. Der perinucleare Raum umschließt aber den Kern nicht vollständig und an solchen Stellen steht die Kernmembran unmittelbar mit dem Grundplasma in Kontakt. Die Außenlamelle der Kernmembran hat Poren von 300–400 Å, die geschlossen oder offen angetroffen werden können; sie haben höchstwahrscheinlich für den Austausch kleinerer und größerer Moleküle Bedeutung.

Das Kernkörperchen (Nucleolus) gehört zu den charakteristischen Strukturen des Nucleus und findet sich einzeln oder zu zweit in allen Zellen des tierischen Organismus. Bei Zellen mit starker Sekretionstätigkeit können auch Anteile der sogenannten Nucleolarsubstanz im Kerninnern unregelmäßig verteilt auftreten. Der Nucleolus besteht aus einer osmiophoben Grundsubstanz, in die kleinere osmiophile Partikel oder Granula eingebettet sind. Diese Körner können zu fadenförmigen oder rosenkranzartigen Strukturen zusammengeschlossen sein, denen die Bezeichnung Nucleonemata gegeben wurde. Embryonalzellen zeichnen sich durch auffallend große Nucleoli aus. Nahrungsentzug verkleinert die Größe der Nucleoli von Leberzellen schon in den ersten 24 Stunden auf die Hälfte. Beim Kernkörperchen ist bisher keine Hüllmembran festzustellen gewesen. Die Bildung der Nucleolarsubstanz scheint an bestimmten Einschnürungsstellen bestimmter Chromosomen, den sogenannten Nucleolenchromosomen, zu erfolgen, wobei es nicht sichergestellt ist, welche Bedeutung den sogenannten «prenucleolar bodies» tatsächlich zukommt. Die Nucleolen selbst sind fortwährend in Ab-, Um- und Aufbau begriffen. Es ist möglich, daß dabei Nucleolusmaterial im Verlaufe des Zellteilungszyklus zu den Chromosomen zurückströmt.

Die Mikrospektrophotometrie im UV-Licht, in Verbindung mit mikrochemischen Methoden, läßt die Anwesenheit von Proteinen und RNS im Nucleolus erkennen. Die Nucleoproteide des Kernkörperchens zeichnen sich durch große Löslichkeit aus.

Als Hauptfunktion für die Nucleoli wird von der Schule Caspersson die Zentralstellung innerhalb der Proteinsynthese der Zelle angesehen, und es wird als sicher angegeben, daß der Nucleolus am Zusammenwirken von Zellkern und Cytoplasma beteiligt ist.

Der Kern ist für den Übertritt von Substanzen des Nucleolus in das Grundcytoplasma verantwortlich. Einzelne Forscher beobachteten ein sogenanntes «Durchschleusen» ganzer Kernkörperchen durch die Kernmembran; in Zellkulturen fand sich bei lebenden Zellen die Abgabe von Kernmaterial, bestehend aus kleinen Nucleoluspartikeln, an das Cytoplasma. Diese Vorgänge sind vor allem in Drüsenzellen und in Zellen mit erhöhtem Stoffwechsel gehäuft anzutreffen. Die Nucleolussubstanz ist in solchen Fällen oft im gesamten Kern anzutreffen, an der Kernmembran aber in verstärktem Ausmaß.

Im Ruhekern (Interphasekern) erscheint das Kernplasma optisch homogen, nach der Dehydratation werden Kernstrukturen sichtbar, die fast das gesamte Kerninnere ausfüllen. Diese Kernstrukturen gehören zum Chromatin. Zwei Arten von Chromatin sind zu unterscheiden: das Euchromatin und das Heterochromatin. Heterochromatin ist dichter und färbt sich stärker. Dies dürfte auf einem höheren Nucleinsäuregehalt und einer kompakteren Struktur beruhen.

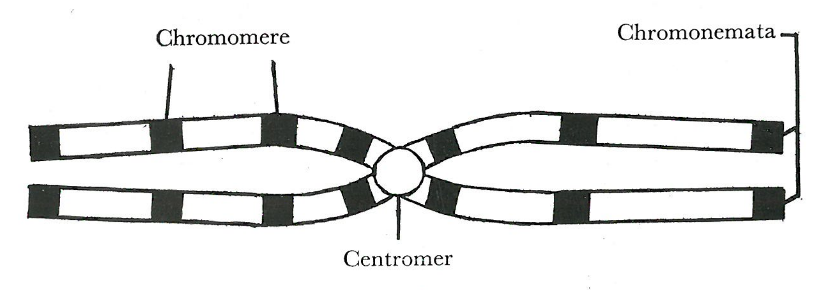


Abbildung 3
(aus Langley, L. L., 1961)

Die Größe der Chromosomen reicht von etwa 1 μ bis 2000 μ (Drosophila); jedes Chromosom (Abb. 3) ist gewöhnlich längsgeteilt in die Chromonemata, die perlenschnurartig die sogenannten Chromomeren enthalten. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob die Chromomeren eine besondere Chromatinzusammensetzung aufweisen oder ob ihre Unterscheidung eher durch Struktureigenheiten bedingt ist. In jedem Chromosom ist noch eine hellere Einschnürung, das Centromer. Es besitzt meistens weniger DNS als die übrigen Chromosomenabschnitte.

Die Desoxyribonucleinsäure (DNS) ist ein wesentlicher Bestandteil des Zellkerns mit grundlegenden Aufgaben, vor allem bei der Vererbung. Die DNS ist eine hochmolekulare Verbindung (Molek. Gew. 500 000–20 000 000) und der Aufbau besteht aus mehreren Mononucleotiden, die sich aus einem Nucleosid + Phosphorsäure zusammensetzen. Die Nucleoside bestehen aus einer Pentose (Desoxyribose) und einer organischen Base (Adenin, Guanin; Cytosin, Thymin). Die Ribonucleinsäure (RNS) enthält Ribose und an Stelle von Thymin die Pyrimidinbase Uracil. Die langen Ketten des DNS-Moleküls bestehen demnach aus zahlreichen Mononucleotiden, wobei sich zeigt, daß sich die zwei «Kettenmoleküle» eines solchen DNS-Moleküls spiralenförmig im entgegengesetzten Sinn um eine geometrische Längsachse winden (Abb. 4). Der Durchmesser einer solchen DNS-Spirale beträgt 20 Å. Im Zellkern liegen sicherlich mehrere verschiedenartig aufgebaute DNS-Moleküle vor, wobei der genaue Einbau der Moleküle der DNS in die einzelnen

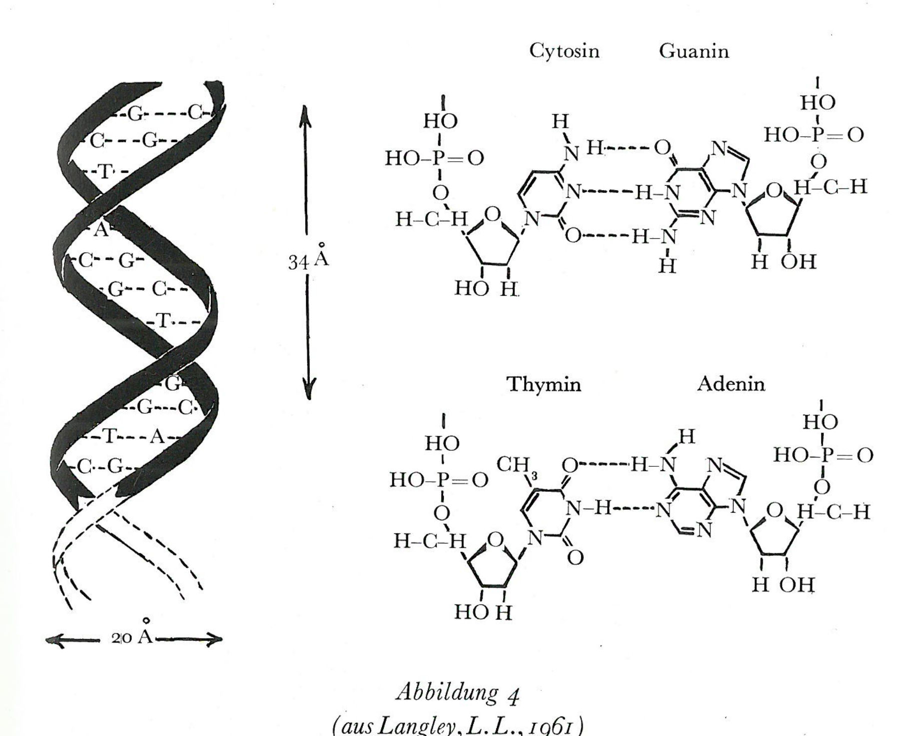


Abbildung 4
(aus Langley, L. L., 1961)

Chromosomen erst teilweise geklärt ist. Der eigenartige Aufbau der DNS-Spirale erleichtert das Verständnis der sogenannten «Verdoppelung der DNS» im Verlauf der Zellteilung und gibt darüber hinaus Einblick in den Mechanismus der Vererbung (Abb. 5).

Neben der DNS sind auch Proteine in Form der Desoxyribonucleoproteide am Aufbau der Chromosomen beteiligt (Histon, Nucleohiston). Zusammen mit den Ribonucleoproteiden bilden sie die Nucleoproteide. RNS findet sich in geringen Mengen in den Teilungschromosomen, vor allem aber im Nucleolus. Manche Forscher sind der Ansicht, die RNS werde durch die DNS gebildet. Die DNS hat bei jeder Tierart in den verschiedensten Geweben gleichen, wahrscheinlich sogar artspezifischen Aufbau; sie existiert nur im Kern. Die RNS hat in den einzelnen Geweben eine jeweils verschiedene Zusammensetzung. Sie findet sich im Kern und im Cytoplasma, vor allem aber in den Mikrosomen und den Mitochondrien. Derzeit ist über die Struktur der RNS noch zu wenig bekannt, um exakte Angaben machen zu können.

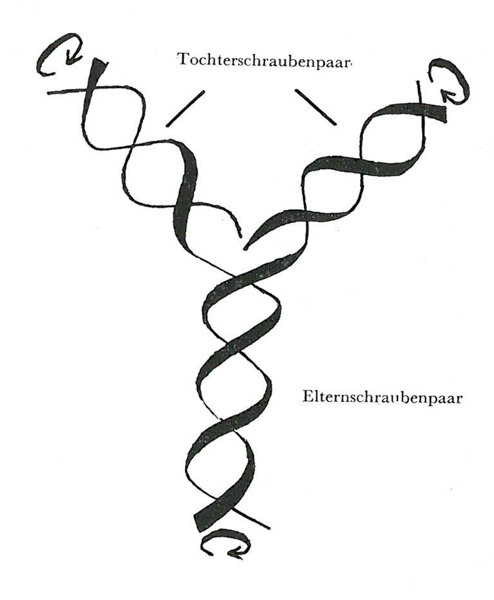


Abbildung 5
(aus Klug, H., 1961)

Der hohe Prozentsatz an RNS im Kern unterstützt die Ansicht über ihre Bedeutung bei der Proteinsynthese, wie im wesentlichen aus folgenden Befunden hervorgeht: In rasch wachsenden Zellen ist der RNS-Gehalt immer hoch, ebenso ist er in Zellen, die Enzyme aufbauen, beträchtlich und schließlich zeigen Zellen von hoher Aktivität, aber ohne wesentliche Proteinleistung, stets recht geringe Mengen RNS. Allgemein läßt sich feststellen, daß eine beträchtliche positive Korrelation, und zwar in den verschiedensten Zellen, zwischen dem RNS-Gehalt und dem Ausmaß der Eiweißsynthese besteht. Auch bei einer Änderung der synthetischen Proteinleistung einer Zelle zeigt sich der Zusammenhang, denn die RNS-Menge steigt oder fällt je nach Größe des Eiweißaufbaues, wobei der RNS-Gehalt der Zelle vor dem Ansteigen der Proteinsynthese zunimmt. Gibt man Ribonuclease, so fällt die Eiweißaufbau-Fähigkeit der Zelle ganz beträchtlich. Wohl am interessantesten ist die Tatsache, daß durch zellfreie Extrakte nur dann eine Proteinsynthese erfolgen kann, wenn neben der löslichen Ribonucleinsäure (sRNS) auch der granuläre Typ (gRNS) dem Extrakt zugesetzt wird.

Die wesentliche Leistung des Zellkerns besteht in der Proteinsynthese und in der Reduplikation seiner Chromosomen. Regenerationsprozesse des Gewebes gehen mit einem Anstieg der Mitosen einher, der Einbau von Phosphat in die DNS ist signifikant erhöht.

Es ist gelungen, aus Zellen der Leber, der Milz, des Thymus und des Darms von Ratten ein Enzym zu isolieren, das in der Lage ist, die DNS aus einem Gemisch der essentiellen Desoxyribonucleosidtriphosphate der DNS in vitro aufzubauen. Dabei müssen aber «primer-Substanzen» der DNS vorhanden sein, um die DNS-Synthese zu ermöglichen. Die sogenannte «vitro-DNS» besitzt dann die gleiche Struktur wie die «primer-DNS».

Die Synthese der DNS erfolgt im Interphasekern und gehört zu den Vorbereitungen der mitotischen Zellteilung. Die Doppelmolekularlagen der Chromosomen werden getrennt und es erfolgt eine genau komplementäre Synthese von Chromosomen entlang der Trennungsebene. Die Energie für die Chromosomenreduplikation ist verhältnismäßig gering, sie wird für die Zellteilung mit 2 Prozent der Gesamtenergieleistung der Zelle angegeben. Wir finden daher bei der Mitose keine besondere Zunahme der Zellatmung.

Nachdem dem Zellnucleus alle Enzyme zur Energiegewinnung fehlen, muß angenommen werden, daß die synthetischen Leistungen des Zellkerns nur durch Energiezufuhr aus anderen Zellgebieten erfolgen können. Es ergeben sich dafür Cytoplasma, Mitochondrien und Mikrosomen und als Energieträger finden sich verschiedene energiereiche Phosphatverbindungen, von denen vor allem dem ATP die wesentliche Rolle zukommt.

Die RNS des Zellkerns gilt heute mit Recht als die «Muttersubstanz» der RN-Säuren des Grundcytoplasmas und der Mikrosomen. Wird Ratten mit Radioisotopen markiertes Phosphat oder Adenin injiziert, dann findet sich radioaktive RNS zuerst und in höherer Aktivität in der RNS des Nucleus und erst später und schwächer in den Mikrosomen und im Cytoplasma. Besonders eindrucksvoll ist die Tatsache, daß radioaktiv markierte RNS von Zellkernen nach Transplantation solcher Zellkerne in «Wirts»-zellen (Amoeben) die Quelle für die Aktivität des Cytoplasmas der Empfängerzelle abgibt.

Aus der großen Zahl der Untersuchungen geht also hervor: a) die RNS wird im Zellkern aufgebaut; b) sie wird vom Zellkern dem Cytoplasma und den Mikrosomen zugeteilt. Nachdem die Dynamik der Zelle im wesentlichen von den Enzymen der Zelle und den intakten Zellstrukturen abhängig ist, Enzyme und Strukturen aber wieder wesentlich auf den synthetischen Eiweißleistungen der RNS des Cytoplasmas und der Mikrosomen aufgebaut sind, kommt dem Zellkern unbestreitbar die Zentralstellung im Gesamtstoffwechsel, das heißt im Leben der Zelle zu.

Es ist wahrscheinlich, daß die Erbfaktoren (Gene) der Chromosomen die Matrize der RNS-Bildung abgeben, und so eine substantielle und strukturelle Verbindung zwischen Genen und der spezifischen Eiweißzusammensetzung eines Organismus, Gewebes oder von Zellen besteht. Andererseits ziehen Genmutationen ganz bestimmte Defekte im Bau- und Betriebsstoffwechsel der Proteine nach sich.

Es wurde auch die Frage diskutiert, ob nicht die RNS den Aufbau der «Rohform» der Eiweißkörper besorgt und erst nachher die spezifische Aus- und Endgestaltung der Proteine durch die DNS erfolgt.

Die DNS ist die stoffliche Grundlage der Gene, sie ist in den einzelnen Zellen konstant. Dies zeigt sich auch darin, daß sie von der

Stoffwechselaktivität der Zelle praktisch unbeeinflußt bleibt. Diploide Zellen besitzen annähernd die doppelte und triploide Zellen die dreifache Menge an DNS. Viele experimentelle Beweise liegen für die engsten Beziehungen zwischen Genen und Enzymen vor, wobei drei wahrscheinliche Möglichkeiten der Wirkungsentfaltung diskutiert werden:

1. Das Gen selbst hat Enzymeigenschaften und steuert so genabhängige Zellprozesse. 2. Das Gen bildet ein Enzym. 3. Das Gen beeinflußt die Enzymtätigkeit durch spezifische Aktivatoren oder Inhibitoren.

Der wahrscheinliche Wirkungsmechanismus wird in einem Zusammenwirken der unter 2. und 3. angeführten Möglichkeiten gesehen, wobei zwischen Haupt- und Nebengenen unterschieden wird, so daß die Ausbildung eines physischen oder psychischen Merkmals als Ausdruck der «komplementären Polygenie» bezeichnet wurde. Ergänzt müssen diese Befunde noch durch die Tatsache werden, daß außer den Genen des Zellkerns für die Übertragung und Ausbildung von Erbanlagen auch extrakaryotische Faktoren, zum Beispiel solche des Cytoplasmas, Bedeutung haben. Neben den Genen (Kernerbanlagen) ist auch das Plasmon (Cytoplasmaerbanlagen) an der Weitergabe des Lebens beteiligt.

d) Endoplasmatisches Reticulum (Ergastoplasma)

Es ist immer wieder aufgefallen, daß Zellen mit stärkerer Proteinsynthese (zum Beispiel Drüsenzellen) eine ausgeprägte Basophilie fadenförmiger Cytoplasmaanteile zeigen. Die ursprünglich als Basallamellen und später als Ergastoplasma bezeichneten Zellstrukturen führten auch den Namen Chromidien. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein dieser Plasmastrukturen, ergaben aber zugleich das Vorhandensein von Lamellenstrukturen, die keine basophilen Eigenschaften besitzen. Vorwiegend sind solche Strukturen in Leberzellen, im Darmepithel und in den Nierentubuli anzutreffen. Die Doppellamellen sind in den Zellen verschieden stark ausgebildet, besonders zahlreich in den exokrinen Drüsen. Der Lamellenaufbau gleicht im wesentlichen dem Grundprinzip der Zellmembranen, das heißt zwei osmiophile Außenlamellen (Dicke je 500 Å), auf denen, unregelmäßig verteilt, zahlreiche, sehr kleine (50–200 Å) stark osmio-

phile Körnchen (Palade-Granula) lagern. Die Palade-Granula sind aber nicht in jeder Zelle zu beobachten und es lassen sich, neben den lamellenartigen Strukturen, in vielen Zellen Netzwerke von Cytoplasmagebilden, bestehend aus Röhrchen, Säckchen, Schläuchen und Bläschen verschiedenen Ausmaßes, feststellen, für die man die Bezeichnung endoplasmatisches Reticulum gewählt hat. Eine zarte Membran von etwa 50 Å Durchmesser trennt das endoplasmatische Reticulum vom Zellplasma. Der Umfang und die Zellbezirke, die von diesen Strukturen erfüllt sind, variieren in den einzelnen Zellarten recht beträchtlich. Oftmals ist fast der ganze Zelleib vom endoplasmatischen Reticulum ausgefüllt, in andern Zellen ist es wieder so spärlich, daß seine Identifizierung nicht leicht ist. Das endoplasmatische Reticulum spiegelt fast in klassischer Form den dynamischen Charakter der Zellen wider, da es in ständigem Umbau begriffen ist.

Das Hohlraumsystem dieses Zellbestandteils zeigt wechselnde Verbindungen zur Zelloberfläche, zur Zellmembran und damit zum Extrazellularbereich. Aber auch zum perinuclearen Zellabschnitt besitzt das endoplasmatische Reticulum offene Röhrchen und Bläschen, so daß eine freie Kommunikation der endoplasmatischen Reticulum-Flüssigkeit mit deren Umgebung gegeben ist. Die Paladeschen Granula finden sich nicht nur an der Oberfläche des endoplasmatischen Reticulums (zum Beispiel Pankreaszellen), auch in freiem Zustand sind sie im Grundplasma vorhanden (zum Beispiel Proerythroblasten). Chemisch bestehen sie überwiegend aus Ribonucleoproteiden.

Die Eiweißsynthese der Zelle erfolgt, nach unseren heutigen Erkenntnissen zumindest bei den meisten sekretorischen Zellen, auch an den Paladeschen Granula, wobei diese winzigen Gebilde in der Lage sind, verschiedene Proteine aufzubauen, die schließlich als Sekret in den nach und nach erweiterten Bläschen des endoplasmatischen Reticulums angehäuft werden und so im Zelleib, zum Beispiel als Zymogen-Granula (Pankreas-Drüsenzellen), letztlich in Erscheinung treten. Nachdem solche Sekrete einen hohen Prozentsatz an Proteinen enthalten, zeigt sich auch, daß der RNS-Gehalt dieser Zellen direkt proportional der Eiweißsynthese liegt. Die Bedeutung der besprochenen Zellstrukturen für den Eiweißstoffwechsel erkennen wir weiter an der Abnahme

der Lamellenstruktur in den Leberzellen hungernder Ratten.

Über den Mechanismus der Abgabe der in den ergastoplasmatischen Ausweitungen anfallenden und gespeicherten Substanzen herrscht noch Unklarheit; der Weg scheint über das Grundcytoplasma zu erfolgen, wobei vielleicht noch andere Zellorganellen mitwirken. Der eigenartige Netzbau des endoplasmatischen Reticulums kann aber auch als Zelleitsystem von der Zelloberfläche ins Zellinnere bis ins Nucleargebiet, und umgekehrt, dienen und so Austauschprozesse von Substanzen nach beiden Richtungen ermöglichen. Die Regulation des osmotischen Druckes der Zelle dürfte ebenfalls unter Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums erfolgen, zeigen doch die Zellen, je nach den Druckverhältnissen ihrer Umgebungsflüssigkeiten, eine unmittelbare Erweiterung oder Einengung ihres endoplasmatischen Netzwerkes und des perinuclearen Gebietes.

e) Mitochondrien (Chondriosomen)

Die Mitochondrien (Chondriosomen, Chondriokonten, Plastosomen) gehören zu den stets anzutreffenden Zellorganellen fast aller tierischen Zellen (Ausnahme: Normocyten). Es handelt sich um Zellgebilde von 1–5 μ Größe, einem Durchmesser von 0,5–2 μ, die kugelig, länglich oder filiform sind. Einfluß auf ihre Gestalt hat die Tierart, das Gewebe und der Funktionszustand, wobei gerade biochemische und pathologische Prozesse wesentlich die Form und Feinstruktur bestimmen können. Relativ große Mitochondrien finden sich in den Leberzellen, dagegen sind die in den Leukocyten kleiner.

Alle Mitochondrien sind im wesentlichen nach dem gleichen Grundplan aufgebaut (Abb. 6). Sie besitzen eine Doppelmembran von der Dicke von 100–250 Å. Von der inneren Hüllmembran ziehen Leisten oder Septen in das Mitochondrieninnere. Für diese Fortsätze hat man die Bezeichnung «Cristae» (Cristae mitochondriales) gewählt. Die Zahl, Form und Größe der Cristae schwanken stark. Sie stehen wahrscheinlich in enger Beziehung zum Funktionszustand der einzelnen Zelle. Die umhüllende Doppelmembran und die Innenformationen sind nach elektronenoptischen Untersuchungen aus zwei osmiophilen Schichten von je etwa 80 Å Durchmesser zusammengesetzt, dazwischen befindet sich ein helleres osmiophobes Gebiet von 40–50 Å Dicke. Die Berechnungen ergeben



Abbildung 6

Mitochondrien in einem Leukocytenschnitt
Die äußere Doppelmembran und auch strukturelle Feinheiten der Cristae sind deutlich zu erkennen. (Vergrößerung 95000 ×)
Aus: M. Bessis «Die Zelle im Elektronenmikroskop», Sandoz-Monographie, 1960

für diese begrenzenden Lamellen einen Aufbau aus nur 2–3 Lipoprotein-Moleküllagen. Der Raum, der von den Membranen und Septen umschlossen wird, hat den Namen «mitochondriale Matrix» erhalten. Das elektronenoptische Bild läßt keine Sonderstrukturen darin erkennen, aber im allgemeinen scheint die mitochondriale Matrix einen dichteren Aufbau als das Zellplasma zu haben. Häufig anzutreffen sind in diesem Mitochondrienbereich sich stärker abhebende Granula von 300–500 Å Durchmesser.

Die räumliche Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle ist sehr variabel, meistens liegen sie unregelmäßig verstreut, manchmal kann man auch eine gewisse polare Anordnung erkennen. Im Zusammenhang mit ihrer Hauptaufgabe, der Energielieferung, sind die Mitochondrien häufig in jenem Zellbereich zahlreicher anzutreffen, wo große Stoffwechselleistungen zu erfolgen haben (Kernnähe, Golgifeld). Die Zahl der Mitochondrien pro Zelle ist wesentlich vom Zelltyp und dessen Stoffwechsellage abhängig. Allgemein konnte festgestellt werden, daß die Zellen aus frühen Embryonalstadien beträchtlich mehr Mitochondrien enthalten als Zellen des erwachsenen bzw. alten Organismus. Wir finden verhältnismäßig viele Mitochondrien in den Leberzellen (etwa 2000–3000), den Nierenepithelien, den Drüsenzellen, dagegen beträchtlich weniger in den Zellen der Milz und des Thymus. Die Mitochondrien können 15–25 Prozent der Zellmasse ausmachen. Ein Gramm Frischleber enthält etwa $33 \cdot 10^{10}$ Mitochondrien.

Biochemische Untersuchungen von durch Zentrifugieren gewonnenen Mitochondrien lassen folgende ungefähre Zusammensetzung erkennen: Proteine etwa 70%, Lipoide etwa 27%, RNS etwa 3%. Der hohe Eiweißanteil beruht sicherlich auf dem Vorhandensein zahlreicher Enzyme, von den Lipoiden gehören etwa 60% zu den Phosphatiden. Neben verschiedenen Enzymen, wie zum Beispiel der Cytochromoxydase, der Succino-Dehydrogenase (Bernsteinsäure-Dehydrogenase) in den osmiophilen Lamellen, wurde auch Ascorbinsäure (Vitamin C) und Axerophthol (Vitamin A) in den Mitochondrien festgestellt. Obwohl die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion bei den Mitochondrien sehr kompliziert sind, ist die Forschung in zunehmendem Maße zu der Ansicht gekommen, daß ein großer Teil der in diesen Organellen anzutreffenden Enzyme ordnungsmäßig in den Membranen (Cristae) lokalisiert ist

und daß das «Multienzymsystem» der Mitochondrien für wesentliche Stoffwechsel- sowie Energieleistungen der Zelle zuständig ist. Durch Zentrifugieren war es auch möglich, sogenannte «große» und «kleine» Mitochondrien zu trennen. Die ersteren enthielten vorwiegend Enzyme, die letzteren besaßen höhere Nucleinsäuremengen und weniger Phospholipide. Aus intakten Mitochondrien lassen sich kleinere Partikel gewinnen, deren Durchmesser unter 1-20 μ liegt und die noch die Fähigkeit der Elektronenübertragung (electronic transfer-particle, ETP) auf Sauerstoff zeigen. In den ETP finden sich gleich viel Cu- wie Hämin-Eisenatome. Es gelang, in Fortführung dieser Untersuchungen, eine Trennung in zwei Strukturkomplexe, von denen der eine Fermente des Citratzyklus, wie Succinoxydase, enthielt, während sich im zweiten Cytochrom A und Cytochromoxydase befanden. Für eine Reihe von Mitochondrienfunktionen ist die Anwesenheit von Phosphat erforderlich. Nur bei intakten Mitochondrien oder in Präparaten aus phosphorylierenden Partikeln (PETP) ist eine oxydative Phosphorylierung festzustellen.

Es liegen zahlreiche Beweise für die annähernd semipermeablen Eigenschaften der Mitochondrien-Hüllmembran vor. Dies zeigt sich vor allem bei ihrer Unversehrtheit, denn die Bildung und Abgabe von ATP an das Cytoplasma ist eine höchst beachtenswerte Leistung dieser Zellorganelle, wobei noch auffällt, daß ATP in den Mitochondrien wahrscheinlich in höherer Konzentration als außerhalb vorliegt und ATP, so wie DPNH, die Membranen nur langsam permeiert. Der Antagonismus von Ca- und Mg-Ionen und das Pyrophosphat scheinen für die Aufrechterhaltung dieses physiologisch bedeutsamen Membranzustandes von Wichtigkeit zu sein.

Die Fähigkeit der Farbstoffspeicherung (zum Beispiel Janusgrün) durch Mitochondrien ist schon länger bekannt. Elektronenmikroskopisch wurde gezeigt, daß es noch viele andere Substanzen gibt, die unter physiologischen und pathologischen Umständen angesammelt werden. Bei der Thalassämie (Cooley-Anämie) und bestimmten hypochromen Anämien findet sich in den Mitochondrien der Erythoblasten und der Reticulocyten Ferritin. Unter normalen Umständen scheint das Ferritin der Mitochondrien Verwendung für einen Umbau in andere eisenhaltige Verbindungen zu finden, die schließlich nach Auflösung der Mitochondrien über das Cytoplasma zur Hämoglobinsynthese bereitstehen.

Gerade bei den Mitochondrien zeigt sich in beeindruckender Weise der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion, denn der sinnvolle Ablauf der meisten Stoffwechselreaktionen ist wesentlich an die Feinstruktur der Zelle gebunden. Paul WEISS hat diese moderne Betrachtungsweise als «Molekularökologie» bezeichnet. Erst das Bemühen, die Zellstrukturen und die Zellfunktionen aus der Perspektive der Makro-Moleküle, aufsteigend zu den Organellen, zu begreifen und die physikalisch-chemischen Kräfte einzubeziehen, ermöglicht ein zeitgemäßes Verständnis der zellularen Organisation und bestimmter biologischer Funktionseinheiten. Die Mitochondrien sind das moderne Beispiel dafür.

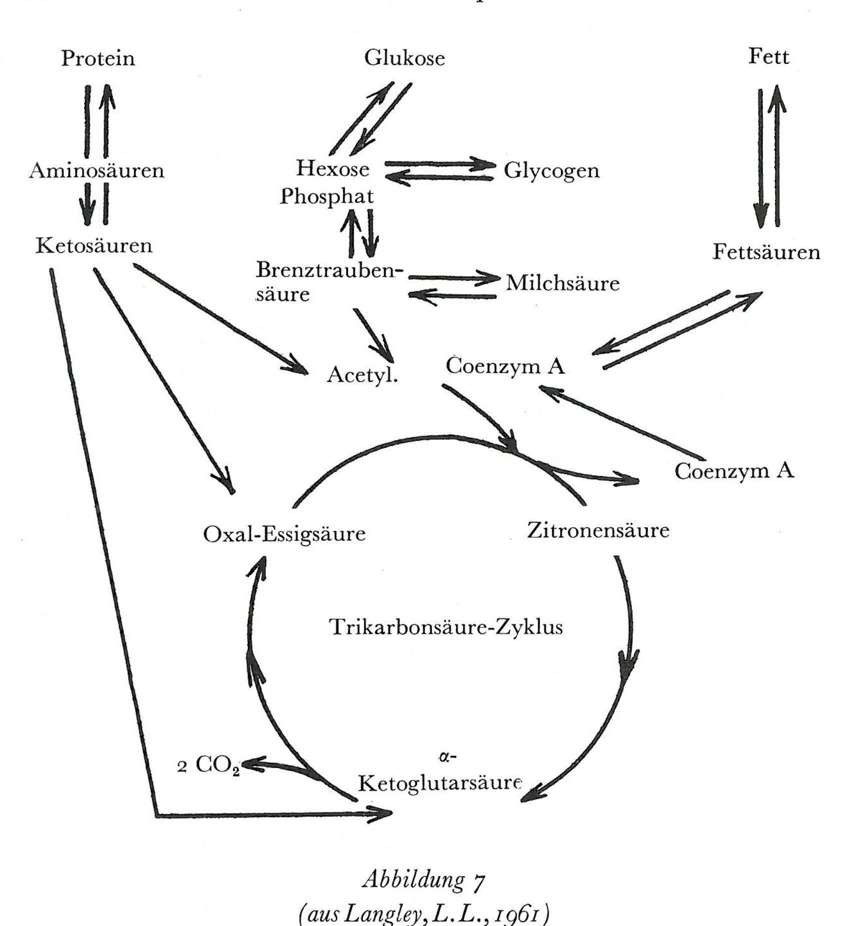


Abbildung 7
(aus Langley, L. L., 1961)

Die Energieproduktion erfolgt in der Zelle vor allem im Wege der biologischen Oxydation. In den Mitochondrien wurden die Fermente des Zitronensäurezyklus und der biologischen Oxydation festgestellt, die in engstem Zusammenwirken den oxydativen Endabbau der Nährstoffe bewirken. Die sogenannte aktivierte Essigsäure ist die gemeinsame Übergangsstufe des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißabbaues. Sie mündet in den Zitronensäurezyklus (Abb. 7), den sie durchläuft, wobei sie durch Einwirkung der En-

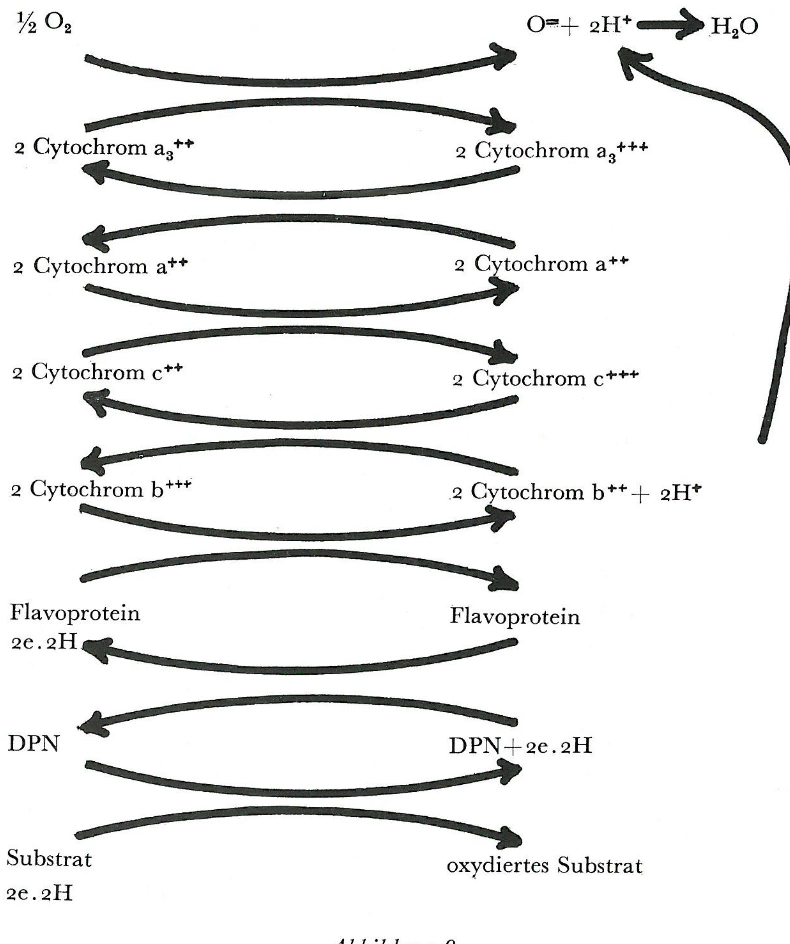


Abbildung 8
(aus Langley, L. L., 1961)

zyme der Atmungskette schrittweise in Kohlensäure und Wasser verbrannt wird. Die dabei in den Umsatzstellen jeweils freiwerdende Energie wird in Phosphatverbindungen verschiedenen Energiegehaltes (ATP, ADP) gespeichert, die dann für die verschiedensten endergonischen Leistungen als Energiespender zur Verfügung stehen. Werden Mitochondrien durch Einwirkung von Ultraschall destruiert, so kann durch die anschließende Zentrifugierung eine Partikelfraktion und eine lösliche Fraktion erhalten werden. Die erstere enthält ATP-ase, Succinoxydase, Cytochrome, Cytochrom-Oxydase, β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase; die letztere Glutaminsäure-Dehydrogenase, Adenylat-Kinase, Fumarase, TPNH-Cytochrom c-Reduktase u. a. Enzyme. In isolierten Membranen der Mitochondrien fanden sich Succinoxydase, Cytochromoxydase und in Fragmenten davon Cytochromoxydase, die Cytochrome a, b, c, Flavoprotein und DPN.

Bei der Suspendierung von Mitochondrien in Rohrzuckerlösung lassen sich schwere und leichte Partikeltypen unterscheiden, wobei sich aus der leichten Fraktion sogenannte «Miniaturmitochondrien» (Durchmesser 1/100 Mitochondrien) abzweigen lassen. Diese winzigen Gebilde zeigen noch die kennzeichnende Doppel-Hüllmembran und Leisten und sind in der Lage, Abbau, Oxydation und Phosphorylierung, wie die Mitochondrien selbst, durchzuführen. Dies hat dazu geführt, sie als «phosphorylating electron transport particle» (PETP) zu bezeichnen. Werden die schweren Mitochondrien mit Ultraschall behandelt, dann finden sich Mitochondrien-Bruchstücke. Diese zeigen, solange sie die Doppelmembran noch erkennen lassen, aus den Reaktionen des Zitronensäurezyklus, den Schritt der Bernsteinsäure-Oxydation, verbunden mit Phosphorylierung. Ist aber die Membranstruktur aufgelöst, dann fällt das innige Zusammenspiel Oxydation-Phosphorylierung aus. In den Mitochondrien verankert sind auch die Fettsäureoxydation, die Phosphatidsynthese und Teile des Harnstoffaufbaues.

Der Mechanismus der Entwicklung und Vermehrung der Mitochondrien ist, trotz intensivster Forschung, noch in vielen Fragen offen. So ist zum Beispiel der Beweis noch ausständig, daß die sogenannten «microbodies» tatsächlich Vorstufen der Mitochondrien sind, weiter ist die Beteiligung des Zellkerns an der Bildung der Mitochondrien fraglich. In embryonalen Zellen scheinen andererseits

tatsächlich Protomitochondrien die Vorstufen abzugeben. Sie zeichnen sich durch eine einfache Hüllmembran und einen elektronenoptisch kontrastreichen Innenkörper aus. Diese Protomitochondrien wachsen und erreichen dabei schließlich den typischen Mitochondrien-Feinbau.

Wachstumsprozesse können bei Aerobiern nur bei intakter Mitochondrienstruktur und -funktion erfolgen, denn beim Wachstum lebender Substanzen handelt es sich vorerst um Vorgänge an sich selbst erhaltenden und sich selbst vermehrenden Strukturen unter Benützung der strukturgebundenen Atmung und der Bildung von phosphatreichen Energieträgern (ATP). Die höheren Zellen des Organismus erhalten den größten Teil der für die Eiweißsynthese während des Wachstums benötigten Aminosäuren über das Blut und die Interzellularflüssigkeit. Durch aktives Verhalten der Zellmembranen kommt es zu deren beträchtlicher Anreicherung im Cytoplasma und struktureller Bindung. Die bei den Wachstumsprozessen regulierenden Hormone (STH, Corticoide, Sexualhormone) dürften ihre Wirkung über die verschiedenen Grenzflächen der submikroskopischen Zellorganellen entfalten, wobei aber nicht übersehen werden soll, daß der harmonische Wachstumsvorgang des Einzelnen vorwiegend von den Genen gesteuert wird.

f) Mikrosomen

Aus den verschiedensten tierischen Zellen (vorwiegend Leber und Pankreas) können durch Homogenisieren und Zentrifugieren kugelige oder bläschenförmige Gebilde (Durchmesser 500–2000 Å) gewonnen werden, die in ihrer Gesamtheit als Mikrosomen (Claude-Partikel) bezeichnet werden (in der Leberzelle entfallen etwa 20% der Zellmasse auf die Mikrosomen). Dabei finden fließende Übergänge von den kleinsten bis zu den größten Formen statt. Heute herrscht weitgehend die Meinung, die Mikrosomen seien nur Teilchen des Ergastoplasmas oder des endoplasmatischen Reticulums, vielfach sogar Palade-Granula. Für die kleineren kompakteren Gebilde (130–150 Å) wurde der Name Ribosomen vorgeschlagen.

Die bläschenförmigen Mikrosomen werden in «glattwandige» und «rauhwandige» unterteilt. Ribosomen finden sich bei den «Rauhwandigen» an der Bläschenoberfläche. Die beiden hier beschriebenen Mikrosomenformen bestehen überwiegend aus Lipoi-

den, die Ribosomen dagegen fast zur Gänze aus Ribonucleoproteiden. In Ribosomen finden sich wechselnde Mengen von Phosphatasen, Proteasen und Glucoronidasen. Es ist möglich, daß die Glukose-6-Phosphatase nur in den Mikrosomen (Leber, Niere) vorkommt.

Die Funktion der Mikrosomen ist noch vielfach unbekannt; sie scheinen, nach Ansicht vieler Forscher, bei der Proteinsynthese der Zelle, vielleicht auch bei deren Lipidstoffwechsel, eine Rolle zu spielen. So ist die Ribose-Nucleinsäure tatsächlich in der Lage, Proteine aus Aminosäuren aufzubauen. Jedes verstärkte Wachstum, zum Beispiel einer Hefekultur, geht parallel mit der Mikrosomenzahl der Zellen, also dieser so reichhaltigen RNS-Organellen.

In den Mikrosomen kommt es zum wichtigsten und entscheidendsten Schritt der Proteinsynthese, denn die RNS der Mikrosomen dienen als «Matrize» für den Aufbau der Eiweißkörper. Das Matrizenmuster gewährleistet planmäßige Sichtung, Ordnung und Verknüpfung der dem Proteinmolekül zugrundeliegenden Aminosäuren. Werden Cytoplasma und Mikrosomen von Rattenlebern mit radioaktiv markierten Aminosäuren zusammengebracht, so findet sich schließlich in den Mikrosomen ein markiertes Albumin. Bei der Abgabe der in den Mikrosomen aufgebauten Eiweißkörper sind Mg-Ionen, ATP und weitere bisher noch unbekannte Faktoren des Zellplasmas mittätig.

Manche Forscher sehen die Mikrosomen für eine «Partikelpopulation» der Zelle sui generis an, und zwar vor allem auf Grund ihrer spezifischen Enzymausstattung und Antigeneigenschaften.

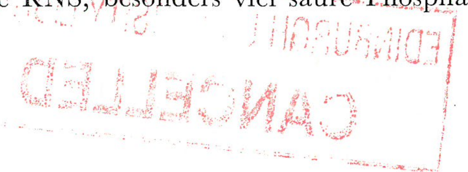
g) Zentralkörperchen (Centrosom)

In der Nähe des Kernes und meistens im Zentrum der Zelle existiert vielfach eine lichtmikroskopisch helle Zone, in der sich ein oder zwei gerade noch sichtbare stärker gefärbte Körperchen, die Centriolen, befinden. Elektronenmikroskopisch zeigen sich die Zentralkörperchen als hochdifferenzierte Zellstrukturen, die auch in den Zellen verschiedener Tierarten (Maus, Ratte, Huhn) den gleichen Aufbau zeigen. Das Centriol besteht aus einem Hohlzylinder von 5000 Å Länge und 1500 Å Durchmesser, die Zylinderwand setzt sich aus 9 parallel- und längsverlaufenden osmiophilen Röhrchen zusammen, deren Innendurchmesser ca. 200 Å beträgt. In den Leukocyten ist

der Aufbau der Centriolen noch durch einen doppelten Kranz kleinster Gebilde um den Zentralzylinder erweitert. Bei der hypothetischen Rekonstruktion des Centriols kommt zu dem inneren Hohlzylinder noch ein Doppelkranz aus je 9 kugelförmigen Gebilden (pericentriolare Satelliten). Sie sind mit dem Zentralzylinder durch sogenannte «Brücken» verbunden. Die Kugelgebilde dürften ihre Entstehung von den die Centriolen umgebenden Asterfiguren herleiten. Die Centrosomen sind den Basalkörperchen, wie sie sich in der Basis von Zellen finden, die Zilien, Geißeln oder Flimmerhaare tragen, gleichzusetzen. Vom Zentralkörperchen aus reichen, weit in das Cytoplasma, strahlenförmige Filamente (Asterfigur), die zusammen mit dem Centriol eine führende Aufgabe bei der Zellteilung haben. Der chemische Aufbau der Centriolen und Basalkörper ist noch ungeklärt.

h) Golgi-Apparat

In unmittelbarer Nachbarschaft des Zellkerns befindet sich in vielen Zellen ein sehr charakteristisches Zellgebilde, der sogenannte Golgi-Apparat. Waren früher seine Existenz, Struktur und Funktion äußerst umstritten, so hat das Elektronenmikroskop wenigstens die ersteren Fragen geklärt. Der Golgi-Apparat setzt sich aus mehreren Diktyosomen zusammen, die entweder voneinander unabhängig vorliegen oder mit ihren Rändern zusammenhängen. Das Diktyosom selbst besteht aus 5–10 flachgedrückten Säckchen, deren Aufbau aus einer osmiophilen Doppelmembran und einer osmiophoben Zwischenschicht im Gesamtdurchmesser von 150–100 Å den bekannten Grundbauplan vieler Organoid-Membranen zeigt. Je nach Schnittführung findet sich also um die Centriolen eine verschieden stark ausgeprägte Ansammlung von Säckchen, kleinen Bläschen oder Vacuolen, die wohl kleiner sind als die des endoplasmatischen Reticulums, in ihrer Gesamtheit aber den Golgi-Apparat (0,4–1 μ × 0,15–0,3 μ) ausmachen. Über die tatsächlichen Funktionen des Golgi-Apparates ist man im wesentlichen vorerst nur auf Vermutungen oder Hinweise angewiesen. In der «Golgi-Zone» kann es zur Anreicherung von Ascorbinsäure (Vitamin C) kommen. Einzelne Forscher berichten über einen hohen Gehalt an Phospholipiden, RNS und Phosphatasen im Bereich des Golgi-Feldes, andere Beobachter fanden keine RNS, besonders viel saure Phosphatasen und Phos-



pholipide. Weiter scheint der Golgi-Apparat ein «Feld kondensierenden Stoffwechsels» darzustellen, da die in der Zelle aufgebauten Proteine, Lipide und Wirkstoffe dorthin transportiert und gespeichert werden sollen. Der Golgi-Apparat wird auch in enge Beziehung zu den einzelnen spezifischen Aufgaben der Zellen (zum Beispiel Pankreas, Zymogengranula) gebracht. Beobachtungen liegen vor, die an eine Mitbeteiligung der Diktyosomen am Auf- und Umbau des endoplasmatischen Reticulums denken lassen. Die Flüssigkeitsbewegungen innerhalb der Zelle und die Kontrolle der Freigabe sekretorischer Substanzen sollen ebenfalls in den Aufgabenbereich dieser Zellorganelle fallen.

i) Vacuolen

Vielfach werden in den Nucleolen und im Cytoplasma lebender Zellen bläschenartige Gebilde verschiedenen Ausmaßes angetroffen, die den Namen Vacuolen erhalten haben. Vor allem finden sich Vacuolen der Pinocytose und kontraktile Vacuolen in Drüsenzellen und Granulocyten. Bei der Pinocytose kommt es zum Ausstülpen eines feinen Hyaloplasmaschleiers an der Zellmembran. In der Zentralregion des Plasmaschleiers lichtet sich das Material, hier entsteht die Vacuole, die Ränder verdichten sich und während der Flüssigkeitstropfen, oftmals Aminosäuren oder Proteine enthaltend, umschlossen wird, hat sich die Vacuole abgerundet und das Zellinnere erreicht. Auf diesem Weg kann eine diskontinuierliche Flüssigkeits- oder Materialaufnahme in die Zelle erfolgen. Die Vacuolen enthalten den sogenannten «Saft». Sie dienen zweifellos dem Transport von Material in das Zellinnere und nach außen, und weiter sind Konzentrationsprozesse innerhalb der Vacuolen, verschiedene Enzyme, Stoffänderungen sowie Speicherungsvorgänge festzustellen. Intravenös injiziertes Protein fand sich bei Ratten in solchen Zellvacuolen. Beziehungen zu Zellorganellen, wie Golgi-Apparat oder Mitochondrien, werden vermutet und Zusammenhänge mit der Pinocytose und dem Übergang von Mikrovacuolen in größere Vacuolen werden beobachtet. Der Aufbau und Abbau von Vacuolen verläuft vielfach recht rasch.



Die therapeutische Technik

VON DR. MED. J. STEIN, HEIDELBERG

Gewinnung, Zubereitung und Anwendung von Injektionspräparaten aus Zellgeweben

Die von NIEHANS als «Zellulartherapie» bezeichnete Methode der Injektions-Implantation heteroplastischen Materials zu therapeutischen Zwecken hat sich aus der chirurgischen Transplantation von Drüsen entwickelt. Die Zellulartherapie ist eine modifizierte und erweiterte Form der Transplantation. Statt der operativen Einpflanzung einer Drüse als Ganzes wird in der Zellulartherapie eine Suspension von Einzelzellen und kleinsten Zellverbänden intramuskulär injiziert *(Implantatio per injectionem)*.

Die technische Methode der Injektionsimplantation wurde erstmalig von dem Breslauer Chirurgen KÜTTNER im Jahre 1912 mitgeteilt, geriet aber wieder in Vergessenheit.

1927 haben KURTZAHN und HÜBENER über Schilddrüsenüberpflanzung «durch Injektion» bei der Behandlung myxödematöser Kinder berichtet. 1929 publizierte KÜTTNER einen kurzen Beitrag über die «Injektionstransplantation endokriner Drüsen» und beschrieb eine besondere Injektionsspritze.

NIEHANS hat unabhängig davon 1931 diese Methode bei seinen eigenen Transplantationsversuchen wiederentdeckt und im Laufe der folgenden Jahre zu einem umfassenden Behandlungsverfahren entwickelt.

Am 1. April 1931 wurde NIEHANS eine junge Frau zur Transplantation von Epithelkörperchen überwiesen, weil sich nach Strumektomie eine postoperative Tetanie entwickelt hatte. Die Patientin war in so schlechtem Zustand, daß eine ordnungsgemäße operative Einpflanzung nicht möglich schien. Um mit bereits beschafften Kalbs-Epithelkörperchen wenigstens eine Teilwirkung zu erzielen, zerkleinerte NIEHANS sie, schwemmte sie mit Ringerlösung auf und instillierte sie durch einen Troikart in die Pectoralis-Muskulatur. Der Erfolg dieser als Provisorium gedachten Maßnahme war so gut, daß NIEHANS in der Folgezeit – nunmehr durch Injektion – Suspensionen auch anderer Drüsen und später von Organen wie Leber, Herz, Niere usw. implantierte.

Nicht so sehr die technische Abwandlung der Transplantation war dabei die therapeutische Neuheit, sondern das erweiterte Anwendungsspektrum über die bis dahin verwendeten Inkretdrüsen hinaus auf parenchymatöse Organe und andere Gewebearten sowie die planmäßige therapeutische Verwendung von *fetalem* Implantationsmaterial.

In der Zellulartherapie werden soweit wie möglich die Organe von tierischen Feten im Endstadium der intrauterinen Entwicklung genommen, denn fetale Zellen sind leichter steril zu gewinnen und werden ihrer geringen anaphylaktogenen Eigenschaften wegen vom Empfänger besser vertragen. Weil jedoch Hypophyse, Testis, Ovar, Nebenniere und Parathyreoidea beim Feten noch nicht genügend aktiviert oder zu klein sind, werden diese Drüsen vom Jungtier entnommen. Als Spendertiere dienen vorwiegend Kälber und Jungschweine. Fetale Gewebe werden vorzugsweise von Schafsfeten gewonnen, die ein bis zwei Wochen vor der Geburt stehen. Grundsätzlich sollen nur ausdifferenzierte fetale Gewebe verwendet werden und keine undifferenzierten embryonalen Zellen. Schafe werden als Spendertiere bevorzugt, weil sie gesund und widerstandsfähig sind, sich als Herde leichter absondern lassen und weil eine Allergie gegen Schafseiweiß selten ist. Schafe werden kaum für die Herstellung von Seren verwendet.

Bei der Gewinnung von heterologen Implantaten kommt es auf *Schnelligkeit* und *Asepsis* an. Die Zeit von der Organentnahme bis zur Injektion der Zellaufschwemmung – beziehungsweise bis zur Tiefkühlung bei «Eiszellen» und «Trockenzellen» – soll so kurz wie möglich sein, um der Autolyse zuvorzukommen. NIEHANS meint, die biochemische Ursprünglichkeit der zu implantierenden Gewebe sei eine Voraussetzung für volle therapeutische Wirksamkeit. Hierin unterscheidet sich seine Methode grundsätzlich von der Gewebetherapie FILATOVS, der das Gewebe im Eisschrank altern läßt, um die Entwicklung hypothetischer «biogener Stimulatoren» zu fördern. Nach den Erfahrungen von NIEHANS und vieler seiner Schüler kommt es hingegen darauf an, daß die überpflanzten Zellen undenaturiert sind. F. SCHMID hat auf Grund biochemischer und histochemischer Untersuchungen diese Auffassung bestätigt.

Die Denaturierung der Zellgewebe geschieht durch die bald nach der Tötung des Spendertieres einsetzenden autolytischen Vorgänge.

Die Autolyse beginnt bei den einzelnen Organen verschieden schnell, etwa 20 bis 40 Minuten nach dem Tode. Stark fermenthaltige Organe, wie Pankreas, Leber, Nebenniere – aber auch Milz und Niere – gehen bald in Autolyse über. Sie müssen deshalb schnell entnommen, präpariert und dann entweder injiziert oder durch Tiefkühlung konserviert werden. Die Technik der Gewinnung und Zubereitung von Spendergeweben ist nicht schwer zu erlernen, muß aber geübt werden. Selbst der Geübte braucht mindestens 10 bis 12 Minuten für die Entnahme einer Nebenniere, deren Zerkleinerung, Anfertigung der Suspension und Injektion.

Zellaufschwemmungen können auf zwei Wegen von Keimen befallen sein: Erstens kann das Tier krank sein und Erreger beherbergen. Diese Möglichkeit läßt sich durch eine gründliche Voruntersuchung ausschließen. Ein gesundes Tier hat in den Organen, die für therapeutische Zwecke entnommen werden, mit größter Wahrscheinlichkeit keine pathogenen Erreger. Das gilt besonders für gesunde Feten eines gesunden Muttertieres.

Die zweite Möglichkeit einer Verunreinigung besteht bei der Entnahme der Organe im Schlachthaus und während ihrer späteren Verarbeitung durch Keimbefall aus der Luft oder durch unsteriles Arbeiten. Im Schlachthaus können alle überhaupt denkbaren Keime vorkommen. Bakteriologen haben festgestellt, daß vorwiegend mit folgenden Mikroorganismen gerechnet werden muß:

Kokken, Schimmelpilze, Hefepilze, Sarcinen und Sporenbildner aus der Subtilis- und Mesentericusgruppe.

Im allgemeinen sind es apathogene, harmlose Saprophyten; aber es können auch virulente Erreger darunter sein.

Um eine Unsterilität zu vermeiden, soll die Entnahme der Organe im Schlachthaus und ihre spätere Zubereitung nach den Grundsätzen der chirurgischen Asepsis erfolgen. Bei der Sterilisation der Instrumente, bei ihrer Verpackung und ihrem Transport sowie bei ihrem Auslegen zum Gebrauch im Schlachthof gelten die gleichen Vorschriften wie für einen aseptischen Eingriff im Operationssaal. Der Keimgehalt der Luft in Schlachträumen ist hoch. Darum müssen Instrumente und Behälter gut mit sterilen Tüchern abgedeckt sein. Die Behälter, in denen die entnommenen Organe aufgenommen werden sollen, müssen einwandfrei sterilisiert sein. Einfaches Auskochen genügt nicht. Entweder ist alles bei mindestens

180° Celsius trocken zu sterilisieren oder unter Dampf im Autoclaven. Der Operateur und die Helfer sollen einen Kittel tragen und einen sterilen Mundschutz. Wenn nicht rein instrumentell gearbeitet werden kann, müssen sterile Gummihandschuhe angezogen werden. Wo die örtlichen Verhältnisse es zulassen, sollte man die Organe in einem gesonderten Raum entnehmen, getrennt von dem Ort der allgemeinen Schlachtung. Eine Raumdesinfektion durch Formalin oder Aerosole sollte vorangehen.

Die Spendertiere müssen vor der Tötung und der Exenteration in desinfizierenden Lösungen gebadet werden. Wenn es dadurch auch nicht gelingt, alle Mikroorganismen im Fell abzutöten, so werden sie doch wenigstens fixiert und nicht mehr mit dem Staub aufgewirbelt. Sind diese Maßnahmen nicht möglich, so sollen die Organe frühzeitig vor Beginn der allgemeinen Schlachtung entnommen werden. Dann ist die Luft noch keimärmer als später, wenn durch die vielen Tiere mit verschmutzten Fellen und die starke Luftbewegung unzählige Mikroorganismen hochgewirbelt werden.

Es soll schnell gearbeitet werden, um die Gewebe nur kurz der Luft auszusetzen. Die Instrumente müssen gut abgedeckt und in unmittelbarer Nähe des Operationsfeldes bereitgelegt sein. Die sterilen Behälter für die Organe müssen von einem Helfer nahe an den eröffneten Tierkörper herangehalten werden, damit die Organe selbst nur kurz der Luft ausgesetzt sind. Die Deckel der Aufbewahrungsgefäße hebe man nur so kurz und knapp ab, wie gerade erforderlich. Während des operativen Vorganges wechsle man häufig die Instrumente.

Der Arzt soll den Schlachter mit seinem Messer nur den ersten Schnitt durch die Körperdecke machen lassen und dann alle weiteren Schnitte mit sterilem Instrumentarium selbst ausführen. Es ist gut, die Organe so weit es geht zunächst mitsamt den sie umgebenden bindegewebigen Hüllen und Fettschichten zu entnehmen. Eventuell vorhandene Luftkeime siedeln sich auf diesen Hüllen an. Später lassen sich unter sterilen Kautelen und unter Instrumentenwechsel diese Hüllen abpräparieren und beseitigen.

Manche Ärzte, die Zellulartherapie ausführen, legen die entnommenen Organe auf dem Schlachthof in ein steriles Gefäß mit antibiotischer Lösung. Der Wert dieser Maßnahme ist zweifelhaft. Man kann mit Antibiotika immer nur die jeweils empfindlichen Erreger

hemmen oder abtöten. Das ist aber nur ein Teil aus dem breiten Spektrum der auf dem Schlachthof vorkommenden Keime. Die Anwendung bakteriostatischer Lösungen verführt leicht dazu, in der Asepsis nachlässig zu werden. Man weiß auch nicht, ob Chemotherapeutika oder Antibiotika nicht den Biochemismus der Gewebe ändern und dadurch die therapeutische Wirksamkeit beeinträchtigen. Aus diesem Grunde – und da es doch nur eine mehr oder weniger symbolische Handlung bleibt – sollte man auf die Anwendung von bakteriostatischen Präparaten verzichten.

Ein Fehler in der Asepsis – der den Unerfahrenen im Anfang unterlaufen kann – ist das versehentliche Eröffnen von natürlicherweise keimhaltigen Tierorganen und Körperhöhlen. So hüte man sich davor, den Darm zu eröffnen und verwerfe die entnommenen Organe, wenn es einmal vorgekommen sein sollte. Vorsichtig sein muß man bei der Gewinnung von Schilddrüsengewebe beim Kalb. Man operiert dabei in unmittelbarer Nähe des Oesophagus und der Trachea, die beim Tier besonders keimhaltig sind. Deshalb kontrolliere man nach dem Herauslösen der Schilddrüse – oder auch der Epithelkörperchen –, ob nicht versehentlich eine der beiden Röhren angeschnitten worden ist.

Die Gefahr der Keimverunreinigung ist bei der Gewinnung von Organen des Jungtieres auf dem Schlachthof größer als bei der Verwendung eines Feten, der ja erst in den Räumen des Arztes unter sterilen Kautelen aus dem in toto mitgenommenen Tragsack des Muttertieres herausgenommen wird. Der gesamte Tragsack muß stets vor Eröffnung und Entnahme des Feten mit einer Jodlösung desinfiziert werden.

Während der Präparation der Spendergewebe zu Zellaufschwemmungen muß ebenfalls strengste Asepsis beachtet werden. Der Raum, in dem die Gewebesuspensionen zubereitet werden, muß zumindest keimarm sein – wenn möglich sogar keimfrei. Die Keimfreiheit wird nach den gleichen Methoden erreicht, die in der Chirurgie für aseptische Operationen angewendet werden. Zur Herabsetzung der Luftkeimzahl sollen Ultraviolettbestrahlung und raumdesinfizierende Maßnahmen (Formalin- oder Aerosoldesinfektion) erfolgen. Sterile Tücher, Instrumente, Gummihandschuhe, Kittel und ein Mundschutz sind selbstverständliche Voraussetzungen. Personen, die Zellsuspensionen zubereiten, müssen sich so waschen und

kleiden, wie das in der Chirurgie üblich ist. Sie dürfen den Zubereitungsraum erst dann betreten, wenn sie steril gekleidet sind.

Da eine absolute Keimfreiheit des ganzen Raumes nur sehr schwer zu erreichen ist, soll in einem sterilen Kasten – einer sogenannten «Präparierkapelle» – der Fet exenteriert und dort auch die Zellaufschwemmung zubereitet werden. Der Fet oder die Organe werden in die Präparierkapelle durch eine an der Stirnseite angebrachte Durchreiche oder Schleuse eingebracht, um eine direkte Verbindung des Kapelleninnenraumes mit der Raumluft zu verhindern. Der Operateur und die Assistenten greifen durch je zwei «Arbeitsdurchgriffe» in der Kapellenwand, an denen Manschetten aus sterilem Billroth-Batist angebracht sind, die sich fest



Abbildung 9
Sterile Präparierkapelle in einem keimarmen Operationsraum. An der Decke UV-Strahler.

um das Handgelenk legen. Nur die mit sterilen Gummihandschuhen bedeckten Hände befinden sich während der Arbeit im Kasten.

Durch eine gewissenhafte Beachtung der beschriebenen Maßnahmen ist es durchaus möglich, steril zu arbeiten. Das haben bakteriologische Kontrollen ergeben, die in Abständen während des gesamten Arbeitsvorganges erfolgten. Die Gefahr eines Spritzenabszesses ist dann bei der Injektion von Zellaufschwemmungen nicht größer als bei anderen intramuskulären Injektionen.



Abbildung 10
Inneres einer Präparierkapelle.

Die durch Injektion zu implantierenden heterologen Gewebe können von dreierlei Art sein:

1. Kurz vorher dem Spendertier entnommenes Zellmaterial wird unmittelbar nach Aufschwemmung injiziert («Frischzellmethode»).
2. Das entnommene Gewebe wird durch Tiefkühlung vorübergehend konserviert, bis das Ergebnis bakteriologisch-serologischer Kontrollen vorliegt. Dann wird das Gewebe wieder aufgetaut, suspendiert und dem Patienten eingespritzt («Eiszellmethode»).
3. Das Gewebe wird in kürzester Frist nach der Entnahme durch Gefriertrocknung (Lyophilisation) konserviert, unter Vacuum in Ampullen abgefüllt und so auf Jahre haltbar gemacht. Die Sterilitätskontrollen erfolgen am gefriergetrockneten Material («Trokkenzellmethode»).

Eine weitere Möglichkeit, die Verwendung von überaltertem, abgestorbenem oder «morientem» Gewebe (BERNHARD), soll hier nicht berücksichtigt werden, weil dieses Verfahren nicht der NIEHANSschen Konzeption entspricht, sondern sich der FILATOVschen Methode und den Gewebsautolysaten nähert.

Die Begriffe «Frischzellen», «Eiszellen» und «Trockenzellen» sind sprachlich nicht schön und sachlich nicht richtig. Die «Frischzellen» sind meistens nicht mehr «frisch» – die «Eiszellen» werden nicht auf die Temperatur des Eises, sondern auf minus 80°C unterkühlt – und der Name «Trockenzellen» verleitet dazu, die Gefriertrocknung mit der profanen Trocknung zu verwechseln. Da sich diese Bezeichnungen aber weitgehend eingebürgert haben und heute schon zu feststehenden Begriffen geworden sind, sollen sie im folgenden mit Vorbehalt verwendet werden.

Die Anwendung von unmittelbar entnommenen Geweben («Frischzellmethode»)

Bei der Herstellung von Gewebsaufschwemmungen zur unmittelbaren Injektion – aber auch bei den anderen beiden Methoden – werden zuerst diejenigen Organe präpariert, bei denen am schnellsten eine Autolyse eintritt.

Gewebsmengen in der Größe eines Würfels von 0,5 bis 1 cm Kantenlänge werden in einer Petrischale mit einer gebogenen Schere zerschnitten. Dann werden 15 bis 20 cm³ Suspensionslösung hinzu-

gegeben. Mit einem speziellen, abgewinkelten Hackmesser wird weiter zerkleinert. Die Zerkleinerung soll so weit gehen, daß die Gewebsstückchen höchstens noch 0,3 mm Kantenlänge haben.

Das Zerhacken mit dem Spezialmesser soll schnell, aber schonend erfolgen, damit wenig Zellen zerstört werden. Wurde eine Zellsuspension in richtiger Weise angefertigt, so finden sich bei mikroskopischer Kontrolle höchstens 10% zerstörte Zellen. Die Suspension selbst zeigt dann Einzelzellen und kleine Zellkonglomerate von einigen hundert bis tausend Zellen.

Mörser, Mühlen, Homogenisatoren, «Starmix» und andere Apparate sind zeitsparend, zerstören aber – wie Versuche ergeben haben – mehr Zellen. Die praktischen Erfahrungen weisen darauf hin, daß die stärkere Zerstörung den Therapieerfolg mindert. Deswegen empfiehlt sich die manuelle Zerkleinerung mit einem Spezialmesser – auch wenn es einige Minuten länger dauert. Für die Zerkleinerung des Gewebes und die Herstellung einer Suspension braucht man je nach Konsistenz des Gewebes 3 bis 5 Minuten. Diese Zeit sollte nicht überschritten werden. Die fertige Suspension wird dann – unter Vermeidung gröberer Partikel – durch den Kanülenansatz einer 10-cm^3- oder 20-cm^3-Rekordspritze aufgesogen.

Suspensionsmittel

Die meisten Zellulartherapeuten verwenden Ringerlösung als Suspensionsmittel. Die von Ringer aus der ursprünglichen, als «physiologisch» bezeichneten 0,9prozentigen Kochsalzlösung entwickelte Salzlösung mit NaCl 0,8, KCl 0,02, CaCl 0,02 und $NaHCO_3$ 0,1, Aqu. dest. ad 100,0 ist kein ideales Aufschwemm-Medium. Als Suspensionsmittel eignet sich besser die Tyrode-Lösung oder aber die für die Gewebekultur entwickelte Pannett-Compton-Lösung in folgender, modifizierter Zusammensetzung:

Lösung A

NaCl	12,11 g
KCl	1,55 g
$MgCl_2 . 6\,H_2O$	1,27 g
Glucose	1,7 g

Mit Aquabidest auf 100 cm^3 aufgefüllt

Lösung B

$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$ . . . . . 20 mg
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ . . . . 572 mg
In 120 cm^3 Aquabidest lösen

Mischung von Lösung A und B

450 cm^3 Aquabidest
30 cm^3 Lösung A
20 cm^3 Lösung B

Tropfenweise abstimmen mit 4prozentigem Natriumbicarbonat auf P_h 7,2 bis 7,4

Injektionstechnik

Zellaufschwemmungen werden durch intramuskuläre Injektion implantiert. Es ist an sich gleichgültig, in welchen Muskel injiziert wird. In der Praxis hat sich die Injektion in den äußeren oberen Quadranten des Musculus glutaeus maximus durchgesetzt. Bei Patienten, die zum Decubitus neigen, kann man auch in den Musculus quadriceps spritzen.

Im Tierversuch hat sich die intraperitoneale Injektion bewährt. Für den Patienten kommt sie nicht in Frage.

Vor einer subcutanen Injektion wird gewarnt, weil Resorptionsschwierigkeiten auftreten können. Bei fettleibigen Patienten achte man darauf, daß die Nadelspitze in der Muskulatur liegt und nicht im Unterhautfettgewebe. Ein Implantat wird aus dem Fettgewebe nicht resorbiert und kann eine sterile Einschmelzung auslösen.

Weil die Suspensionen verhältnismäßig grobe Partikel enthalten, muß man stärkere Kanülen nehmen, mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm. Derart starke Kanülen stanzen manchmal Epidermisteilchen aus. Wird Epidermis durch die Injektion in die Tiefe verschleppt, so kann das zu einem sterilen Abszeß führen. Um das zu verhüten, empfiehlt es sich, Lumbalpunktionskanülen zu verwenden und die Kanüle mit liegendem Mandrin einzustechen. Dadurch wird auch die Gefahr verringert, mit der Kanülenspitze in ein Gefäß zu geraten. Eine intravasale Injektion von Zellsuspensionen ist gefährlich, denn sie kann Embolie und Schock auslösen. Man aspiriere deshalb stets, um zu prüfen, ob die Kanülenspitze in einem Gefäß liegt.

Die Zelldepots, die man durch Injektions-Implantation in die Muskulatur setzt, sollen nicht zu groß sein, sonst ist die Resorption erschwert. Bei Verwendung von frisch entnommenem Gewebe injiziere man nicht mehr als 20 cm³ Suspension an eine Stelle. Höhere Dosierungen müssen auf mehrere Stellen verteilt werden, mit Abständen von mindestens 5 bis 6 cm zwischen den einzelnen Injektionsorten.

Dosierung

Sogenannte «Frischzellen» und «Eiszellen» lassen sich nicht exakt dosieren. Die Art der Gewinnung der Gewebe und ihrer Zubereitung zu einer Suspension gibt keine Möglichkeit zu einer genauen Angabe des Volumens, Gewichtes oder der Inhaltsstoffe. Wenn die Technik der Zerkleinerung des Gewebes und der Zubereitung von Suspensionen beherrscht wird, ergeben sich einigermaßen homogene Aufschwemmungen. In dem Falle entspricht eine Aufschwemmung von 20 cm³ etwa einem Frischgewicht von 0,7 bis 1 g Gewebe. Das unterschiedliche spezifische Gewicht ist jedoch zu berücksichtigen. Die Angabe des Gewichtes besagt natürlich nicht viel. Alle Bemühungen, für Frischzellsuspensionen und Eiszellsuspensionen eine exaktere Dosierung zu bestimmen, waren bisher ohne Erfolg. Die Gewebemengen in den Suspensionen hängen weitgehend von Gefühl und Erfahrung des Therapeuten ab und variieren daher individuell.

Bei Trockenzellen liegen die Verhältnisse günstiger. Hier lassen sich exakte Gewichte der Trockenzellsubstanz angeben. Da die Restfeuchtigkeit bei industriell hergestellten Trockenzell-Präparaten weitgehend konstant ist und um 1 % liegt, ist die in Milligramm angegebene Einwaage wenigstens eine genaue Gewichtsdefinition. Damit ist allerdings noch nichts über den Gehalt an Wirkstoffen gesagt, die für jede einzelne Organart bestimmt werden müßten.

Aus der Praxis der Zellulartherapie hat sich die Erfahrung ergeben, daß der Schweregrad der zu behandelnden Organstörung die Menge der zu injizierenden Zellaufschwemmung bestimmt.

Diese Erfahrung deckt sich mit dem sogenannten *Halsted*-Prinzip. HALSTED hatte 1909 für die autologe und isologe Transplantation endokriner Drüsen nachgewiesen, daß Reaktionen auf das Transplantat um so geringer bleiben, je mehr sich die korrespondierende Drüse in Unterfunktion befand und demnach ein Bedürfnis für das

Transplantat bestand. Aus der Beobachtung, daß bei stärkerer Funktionsstörung größere Mengen Transplantat reaktionslos vertragen werden, läßt sich vielleicht der Rückschluß ziehen, daß der erkrankte Organismus dann auch größere Transplantatmengen aufzunehmen bereit ist.

Die Anwendung von tiefgekühlten und wieder aufgetauten Geweben («Eiszellmethode»)

Die Methode der unmittelbaren Injektion einer Aufschwemmung von frisch entnommenen Geweben hat Nachteile. Da die Zeit zwischen Entnahme und Injektion sehr kurz zu sein hat, muß der Patient entweder in die Nähe des Schlachthofes gebracht werden, oder aber die Schlachtung muß in Nähe der Klinik oder der Ordinationsräume des Arztes erfolgen. Dieser Nachteil läßt sich durch eine gute Organisation weitgehend ausgleichen. Nicht beheben läßt sich bei der Frischzellmethode aber der gravierende Mangel, daß zwischen Entnahme und Injektion keine Sterilitätskontrolle möglich ist. Die Übertragung von Krankheitserregern läßt sich also nicht mit Sicherheit ausschließen – auch wenn man die Tiere noch so gründlich voruntersucht und bei Entnahme und Zubereitung der Aufschwemmungen peinlichste Asepsis beachtet. Aus diesem Grunde wurde die ursprüngliche Frischzellmethode weitgehend verlassen. Sie hat heute eigentlich nur noch historische Bedeutung.

Die meisten Ärzte, die früher «Frischzellen» unmittelbar übertrugen, sind dazu übergegangen, zwischen Entnahme und Injektion der Gewebe eine Sterilitätsprüfung vorzunehmen. Um das zu ermöglichen, wird zwischen Entnahme der Organe und deren Zubereitung als Aufschwemmung eine Tiefkühlung eingeschaltet. Dieses Verfahren hat den Namen «Eiszell»-Methode erhalten. Die Bezeichnung ist zwar kurz und prägnant, kennzeichnet das Verfahren aber nicht korrekt – denn die Organgewebe werden nicht bei 0° C «auf Eis gelegt», sondern mittels einer Kühllösung aus Aceton und Kohlensäureschnee auf mindestens –75° C schlagartig unterkühlt. Das Organgewebe wird vorher mit einer Schere schnell zerkleinert, um die Oberfläche zu vergrößern. Das zerkleinerte Gewebe wird dann in einem Kolben aus Jenaer Glas an der Innenwand verteilt. Der Kolben wird keimdicht verschlossen und in die Kühllösung getaucht. Die Temperatur der Kühllösung von –75° bis –80°C über-

trägt sich durch Leitung in kurzer Zeit auf das Gewebe. Das tiefgekühlte Gewebe wird dann unter sterilen Bedingungen in einer Kühltruhe oder großen Thermosflaschen (Dewar-Gefäß) aufbewahrt. Diese Aufbewahrung kann so lange fortgesetzt werden, wie die tiefe Temperatur beibehalten wird. Autolytische Prozesse laufen bei diesen Temperaturen nicht mehr ab. Vor der Tiefkühlung werden Gewebeproben entnommen, die man an einem Hygiene-Institut oder in einem Veterinär-Untersuchungsamt auf Sterilität prüfen läßt. Haben die Kontrollen Keimfreiheit ergeben, wird das tiefgekühlte Gewebe aufgetaut und zur injektionsfähigen Suspension weiterverarbeitet.

Die Eiszellmethode hat zwar den Vorteil, eine Sterilitätskontrolle zu ermöglichen, aber den Nachteil, durch das Tiefkühlen und spätere Wiederauftauen physikalische Vorgänge auszulösen, die sich auf die Struktur der Zelle auswirken. Die physikalischen Vorgänge hat NEUMANN in dem Kapitel «Konservierungsverfahren» beschrieben.

Anwendung von gefriergetrockneten Zellpräparaten («Trockenzellmethode»)

Als «Trockenzellen» werden ampullierte, lagerfähige Gewebs-Präparate bezeichnet, die durch das Verfahren der Gefriertrocknung haltbar gemacht wurden. Unter Gefriertrocknung versteht man Wasserentzug aus gefrorenem Material. Die Methode der Gefriertrocknung (Lyophilisation) darf nicht mit der banalen Trocknung verwechselt werden. Bis heute kennt man kein besseres Verfahren zur Konservierung von Geweben als die Gefriertrocknung. Während bei anderen Methoden der Trocknung eine Denaturierung des Organeiweißes unvermeidlich ist, werden durch die Lyophilisation – das heißt Sublimation des Gewebswassers aus dem tiefgefrorenen Material – die spezifischen biochemischen Verbindungen und die mikroskopischen und submikroskopischen Strukturen der Zellen in solchem Maße unverändert erhalten, daß zum Beispiel gefriergetrocknete Kleinstlebewesen, Hefezellen, Bakterien oder auch Viren nach teilweise jahrzehntelanger Lagerung bei anschließender Wiederdurchfeuchtung unverändert vermehrungs- und lebensfähig sind.

Als NIEHANS die Zellulartherapie weiterentwickelte, erkannte er schon bald, daß der Methode der unmittelbaren Übertragung von

frisch entnommenen Geweben Grenzen gesetzt sind. Er ließ deshalb an seinem Laboratorium seit 1949 Versuche zur Konservierung der Frischzellen durchführen. Dabei erwies sich das Verfahren der Gefriertrocknung als das geeignetste.

Seit 1954 werden Trockenzellpräparate nach den Methoden moderner industrieller Fertigung von der «Rhein-Chemie GmbH.» in Heidelberg hergestellt. Die Präparate sind unter dem Namen «*Siccacell* (R)» auf dem Markt. Die Liste der lieferbaren Präparate umfaßt 60 verschiedene Organarten.

Bei den «*Siccacell*»-Präparaten ist die Keimfreiheit gewährleistet. Das Werk kontrolliert auf Sterilität und läßt eine Nachkontrolle am Hygiene-Institut der Universität Heidelberg durchführen.

Im Tierexperiment und in klinischen Versuchen wurde die therapeutische Wirksamkeit der unmittelbaren Frischzellen-Übertragung mit derjenigen von «*Siccacell*»-Präparaten verglichen. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede. Alle klinischen Prüfungen und die gesamte Grundlagenforschung zur Zellulartherapie basieren auf «*Siccacell*»-Präparaten.

Erst durch die Entwicklung der Trockenzellpräparate wurde die Anwendung der Zellulartherapie auf breiter Basis ermöglicht. Die korrekte Durchführung von Frischzell-Übertragungen erfordert kostspielige organisatorische Voraussetzungen und belastet den Arzt mit der Verantwortung hinsichtlich der Keimfreiheit und der Übertragung von Zoonosen. Bei den «*Siccacell*»-Präparaten wird die Verantwortung für die Keimfreiheit von der Herstellerfirma übernommen. Der Arzt ist mit diesen Präparaten unabhängig vom Schlachthof und hat die ampullierten, lyophilisierten Zellen jederzeit zur Verfügung. «*Siccacell*»-Präparate sind mehrere Jahre – auch unter tropischen Bedingungen – haltbar, da sie unter Vacuum ampulliert sind. Ein weiterer Vorteil der Trockenzellpräparate ist die exakte Gewichtsangabe des Ampulleninhaltes. Je nach Organart beträgt die Einwaage in den Ampullen zwischen 25 und 150 mg. Durch die Angabe des Gewichtes der Trockenzellpräparate ist wenigstens in dieser Hinsicht die Dosierung definierbar.

Die Applikation der Trockenzellpräparate ist technisch einfach. Die Vacuum-Ampullen mit den Trockenzellen werden aufgesägt, das beigegebene Suspensionsmittel wird hinzugefügt. Innerhalb von

etwa zehn Minuten durchfeuchten sich die Trockenzellen wieder und sind dann injektionsbereit.

Die Möglichkeit, mittels der lyophilen Trocknung konservierte, auf Keimfreiheit geprüfte Zellpräparate herzustellen, hat für die Entwicklung der Zellulartherapie entscheidende Bedeutung gehabt. Durch die Trockenzellen wurde die Gefahr der Übertragung von Zoonosen gebannt.

Prophylaxe der Zoonosen

Als Zoonosen oder Anthropozoonosen werden die von Tieren auf den Menschen übertragbaren Infektionskrankheiten bezeichnet. Ist das Spendertier an einer Zoonose erkrankt, können die Erreger auch dann auf den Patienten übertragen werden, wenn man bei der Gewinnung und Zubereitung der Gewebesuspension unter einwandfreier Asepsis gearbeitet hat. Ein Tier kann an einer Zoonose erkrankt sein, ohne daß der untersuchende Tierarzt es bei der Lebendbeschau oder bei der postmortalen Fleischbeschau feststellen kann. Die üblichen klinischen und pathologisch-anatomischen Untersuchungen reichen oft nicht aus.

Um eine Zoonose mit einiger Sicherheit ausschließen zu können, bedarf es – neben der Überwachung der Herde, der klinischen Untersuchung des lebenden und der Obduktion des getöteten Spendertieres – noch serologischer und bakteriologischer Untersuchungen und zum Teil auch der Allergieteste und der Tierversuche.

Die Bedeutung der Zoonosen-Übertragung für die Therapie mit heterologen Implantaten ist in ihrem ganzen Umfange erst mit der Entwicklung der NIEHANSschen Zellulartherapie erkannt worden. Bevor NIEHANS seine Methode in die Therapie einführte, waren schon jahrzehntelang tierische Gewebe – vorwiegend endokrine Drüsen – bei Patienten implantiert worden. Durch Operation wurden implantiert: Hypophysen, Ovarien, Epithelkörperchen, Schilddrüsengewebe und Testis. FELLINGER (1951) hat über 6000 Hypophysenimplantationen berichtet, die er an seiner Wiener Klinik ausführte.

Wenn man die Publikationen über diese heterologen Organimplantationen nachliest, findet man kaum Angaben über die Verhütung von Zoonosen. In den Beschreibungen über die Technik der Gewinnung und Überpflanzung von tierischen Drüsen finden sich zwar allgemeine Angaben über die Asepsis und gelegentlich auch

Beschreibungen antiseptischer Verfahren, wie zum Beispiel das Einlegen der Drüsen in bakteriostatische Lösungen. Es findet sich aber keine Beschreibung einer konsequenten Voruntersuchung der Spendertiere auf Zoonosen. Trotzdem scheint verhältnismäßig selten eine echte Anthropozoonose auf den Patienten übertragen worden zu sein.

Erst als durch die Zellulartherapie heterologe Gewebeimplantationen in großer Zahl durchgeführt wurden, wandte man sich systematisch der Verhütung von Zoonosen in diesem Zusammenhange zu. Angeregt wurden diese Untersuchungen durch eine Publikation von Bennhold (1954), der einen Fall von Brucellose mitteilte, die nach seiner Meinung durch Frischzelleninjektionen übertragen worden war. Rietschel, der 1955 auf Grund einer umfassenden Umfrage bei 179 Klinikleitern über Zwischenfälle nach Zellulartherapie berichtete, gab an, daß bis dahin 80 Komplikationen festgestellt wurden. Darunter fanden sich 35mal Glutaeal-Abszesse, die wohl auf mangelhafte Asepsis zurückzuführen waren. Die Übertragung einer Zoonose im eigentlichen Sinne wurde von Rietschel nicht berichtet. Obwohl die Zellulartherapie in den Jahren von 1953 bis 1956 sehr häufig – und leider auch kritiklos und ohne die nötige Sorgfalt – ausgeübt wurde, sind Anthropozoonosen im Verhältnis sehr selten übertragen worden. Ab 1956 – als nach der Warnung durch Bennhold, Rietschel, Hoff und andere – Zellimplantationen mit mehr Kritik und Sorgfalt angewendet und Eiszellen und Trockenzellen bevorzugt wurden, sind Komplikationen kaum noch vorgekommen. Eine Übertragung von Zoonosen wurde überhaupt nicht mehr bekannt.

Die methodische Prophylaxe der Zoonosen in ihrer speziellen Ausrichtung auf die Zellimplantation geht im wesentlichen auf Richtlinien von Dahmen, Lerche und Leuchter zurück.

Art und Häufung von Zoonosen sind unterschiedlich bei den einzelnen Tierarten. Die Zoonosen der Spendertiere Rind, Schwein, Schaf und deren Feten kommen in Betracht. Gelegentlich werden auch Kaninchen und Meerschweinchen verwendet. Bei allen diesen Tieren kommen folgende Anthropozoonosen vor:

1. *Bakterielle Infektionen:*
   Tuberkulose, Brucellose, Salmonellose, Listerellose und Pneumokokkose.

Anthropozoonose	Rind	Schaf	Schwein	Kaninchen	Meerschweinch.
Tuberkulose	schraffiert	schwarz	schwarz	schwarz	schwarz
Brucellose melit.	schwarz	schraffiert	weiß	weiß	weiß
Brucellose suis	weiß	weiß	schraffiert	weiß	weiß
Brucellose abortus	schraffiert	schwarz	schwarz	weiß	weiß
Salmonellose	schraffiert	schraffiert	schraffiert	schraffiert	schraffiert
Listerellose	schraffiert	schraffiert	schraffiert	schraffiert	weiß
Pneumokokkose	schraffiert	weiß	weiß	weiß	weiß
Pseudotuberkulose	weiß	weiß	weiß	schraffiert	schraffiert
Staphylokokkose	weiß	weiß	weiß	schwarz	weiß
Lyssa	schwarz	schwarz	schwarz	weiß	weiß
Encephalomyelitis	weiß	schraffiert	schraffiert	weiß	weiß
Influenza	weiß	weiß	schraffiert	weiß	weiß
Aphtenseuche	schwarz	schwarz	schwarz	weiß	weiß
Variola	schwarz	schwarz	schwarz	weiß	weiß
Rickettsien	schraffiert	schraffiert	schraffiert	weiß	weiß
Leptospirose	schraffiert	schwarz	schraffiert	schwarz	schwarz
Toxoplasmose	schraffiert	schraffiert	schraffiert	schwarz	schwarz

Abbildung 11

Übersichtstabelle der bei Spendertieren vorkommenden Zoonosen und deren Häufigkeit. Schwarz: häufiges Vorkommen; schraffiert: geringes Vorkommen; weiß: frei. (Nach M. LERCHE, in W. Kuhn «Zellulartherapie in Klinik und Praxis». Hippokrates-Verlag, Stuttgart, 1956.)

2. *Virus- und Rickettsien-Krankheiten:*
   Lyssa, Encephalomyelitis, Influenza, Psittakosis, Maul- und Klauenseuche, Variola und das Q-Fieber.
3. *Leptospiren* und *Toxoplasmen* gehören ebenfalls zu den Erregern von Zoonosen.

Man hört noch die irrige Auffassung, daß Feten nur selten infiziert seien, weil die Placenta einen Schutzwall gegen die Erreger bilde. Es hat sich aber gezeigt, daß gerade Feten und Jungtiere für eine ganze Reihe von Anthropozoonosen sehr empfänglich sind, weshalb manche der Infektionserreger zum Absterben der Frucht und zum Abortus führen. Auch die Placenten selbst sind von diesen Infektionen betroffen. Das gilt insbesondere für Brucellen, Salmonellen, Listerellen, Leptospiren, Coxiellen und Toxoplasmen.

Die Vorbeugung gegen Zoonosen muß bei der Aufzucht und bei der Haltung der Tiere beginnen. Am gesündesten sind Tiere, die aus bekannten und kontrollierten Herden stammen.

Diese abgesonderten Herden – die auf eigenen Weidegründen gehalten werden sollen, damit sie mit anderen Tieren nicht zusammenkommen – müssen laufend tierärztlich untersucht werden. Klinische Untersuchungen genügen nicht, sondern es müssen auch Blutproben entnommen werden zur bakteriologischen und serologischen Kontrolle. Zusätzlich sind für einige Zoonosen – zum Beispiel Tuberkulose – Allergieteste und Tierversuche erforderlich.

Um mit weitgehender Gewähr auch latent infizierte Tiere zu erfassen, sind bei den einzelnen Krankheiten spezifische Untersuchungsmethoden notwendig:

Tuberkulose: Eine Sicherheit für das Freisein von Tuberkelbakterien gewährt nur die negative Tuberkulinprobe. Tuberkulinpositive Tiere scheiden grundsätzlich als Spender aus.

Brucellose: Im allgemeinen werden auch latent erkrankte Tiere durch serologische Untersuchungen erfaßt. Es gibt jedoch stumme Infektionen, ohne einen positiven Bluttiter. Bei chronischem Verlauf und bei Schwangerschaft kann der Titer schwinden. Aus diesem Grunde empfiehlt LERCHE – vor allem bei Schafen – zusätzlich noch die Intradermopalpebral-Probe zu machen und das zu injizierende Organmaterial in der Kultur zu untersuchen.

Salmonelleninfektionen: Bei latenten Salmonelleninfektionen mit chronischem Krankheitsverlauf kann der Agglutinationstiter bis in den Normalbereich absinken. Infolgedessen kann man sich nicht allein auf die Agglutinationsprobe verlassen, sondern muß zur Sicherheit auch noch einen Kulturversuch ansetzen.

Listerellose: Die durch Listerella monocytogenes verursachte Krankheit hat in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen. Die Listerellose führt zu Meningoencephalitis oder zur septischen Granulomatose und tritt auch als Schwangerschafts-Listeriose auf. Wie häufig die Listeriose bei Haustieren vorkommt, ist noch nicht genügend bekannt. Sie scheint aber relativ häufig zu sein bei Kälbern, Jungschweinen und Schafen. Serologische Methoden wie Agglutination und Komplementbindung genügen nicht zur Diagnose. Zur Erkennung einer latenten Infektion ist neben der bakteriologischen

Untersuchung deshalb auch der Tierversuch an der Maus, am Kaninchen oder Meerschweinchen anzusetzen.

Rickettsiosen: Die verschiedenen Arten der Rickettsien müssen zu den übertragbaren Zoonoseerregern gezählt werden. Für die Gewebsentnahme ist zu bedenken, daß die Rickettsien sich besonders gerne in der Placenta tragender Tiere ansiedeln. Da die Infektionen der Tiere häufig latent und unerkannt verlaufen, müssen infizierte Zellspender durch serologische Untersuchung mittels Agglutination und Komplementbindung ausgeschlossen werden. Von den serologischen Nachweismethoden soll sich am besten der von Coombs, Mourant und Race angegebene Antiglobulin-Sensibilisierungstest eignen.

Leptospirosen: Unter den zahlreichen Leptospiren sind es vor allen Dingen die L.icterohaemoglobinuriae und die L.pomona, die als Zoonosenerreger in Betracht kommen. Die an Leptospirose erkrankten Tiere werden durch serologische Diagnose erkannt. Es müssen aber verschiedene Antigene benutzt werden. Mitreaktionen unterschiedlicher Leptospirenarten können auftreten.

Toxoplasmose: Mit Toxoplasmen infizierte Tiere werden durch Sero-Farbtest und durch die Komplementbindungsmethode erfaßt. Die Zuverlässigkeit der Komplementbindungsmethode ist von der Verwendung eines einwandfreien Antigens abhängig. Da der Wert der einzelnen serologischen Methoden zur Zeit noch umstritten ist, empfiehlt es sich, daneben regelmäßige Tierversuche anzusetzen.

Viruskrankheiten: Es gibt zahlreiche Viren, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden können. Als Beispiele seien genannt: Maul- und Klauenseuche, Tollwut, Influenza, Psittakose und Variola. Diese Erkrankungen lassen sich im allgemeinen klinisch gut erkennen. Es dürfte daher nicht schwierig sein, sie auszuschließen, wenn die Tiere unter laufender veterinärmedizinischer Beobachtung gehalten werden. Schwieriger zu erkennen sind aber verschiedene, durch Viren hervorgerufene Formen von Encephalitiden und Meningo-Encephalitiden, die beim Pferd, aber auch beim Schaf festgestellt wurden. Bakteriologische und serologische Methoden lassen bei der Erkennung der Viruskrankheiten im Stich. Die Viren werden sich deshalb nur mit Sicherheit dadurch ausschließen lassen, daß die Tiere beobachtet und von dem Kontakt mit anderen Tieren ferngehalten werden. Gerade wegen des Ausschlusses von Virus-

krankheiten ist zu fordern, daß Spendertiere mindestens 14 Tage in Quarantäne gehalten und kontrolliert werden.

Die Gefahr einer Übertragung von Zoonosen durch Überpflanzung der von den Tieren entnommenen Organe und Gewebe soll gewiß nicht überschätzt werden. Da eine Zoonosenübertragung aber möglich ist, muß auch alles getan werden, um dieser Gefahr vorzubeugen. Die Sorgfaltspflicht bei der Gewinnung heterologer Implantate vom Spendertier ist genau so groß wie bei der Gewinnung von Impfstoffen und Seren. Es ist beruhigend, daß sich die Übertragung von Zoonosen mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit verhindern läßt, wenn die beschriebenen Vorbeugungsmaßnahmen und Voruntersuchungen gewissenhaft durchgeführt werden.

Konservierungsverfahren, Herstellung und Eigenschaften von Trockengewebe

VON PRIVATDOZENT DR. K. NEUMANN, KÖLN

A. Einführung

Die ursprüngliche Form der Zellulartherapie ist die Injektion von rasch aus dem Spendertier entnommenem, zerkleinertem und ohne Verzug injiziertem Gewebe. Da die Gewinnung solcher «Frischzellen» besondere organisatorische Vorkehrungen notwendig macht, und die schnelle Entnahme an der Schlachtstelle, der Transport und die Zerkleinerung mit der Notwendigkeit, steril zu arbeiten, oft schwer in Einklang zu bringen sind, wurden Wege zur Konservierung des Gewebes gesucht.

Die grundsätzlichen Forderungen an ein Verfahren zur Herstellung einer haltbaren Dauerform (Konserve) sind:

a) daß die für den therapeutischen Effekt essentiellen Eigenschaften des Gewebes nicht geschädigt werden,
b) daß keine Reaktionsprodukte mit unerwünschten Nebenwirkungen entstehen,
c) daß die Konservierungsdauer ausreichend und die praktische Herstellung von haltbaren Präparaten mit angemessenen Mitteln möglich ist.

Es sind mehrere Verfahren beschrieben worden:

«vitale Konservierung»
Kühlung auf Eistemperatur
Tiefgefrieren und
Gefriertrocknung.

Eine große Bedeutung hat von diesen Verfahren vor allem die Gefriertrocknung erlangt.

B. Andere Verfahren zur Konservierung

Außer der noch ausführlich zu besprechenden Gefriertrocknung wurden folgende Methoden zur Konservierung von Gewebe für die Zwecke der Zellulartherapie erprobt:

1. Konservierung durch Gewebezüchtung in vitro

Dieses von BAUER (1949 bis 1954) als «vitale Konservierung» bezeichnete Verfahren besteht darin, das aus dem Spenderorganismus entnommene Gewebe mit den Methoden der Gewebezüchtung in geeigneten Nährlösungen bis zur Injektion überlebend zu halten und zu vermehren. LETTRÉ (1954) hat vorgeschlagen, hierfür in Anlehnung an ERDMANN den Begriff «Gewebepflege» zu verwenden, wenn es sich überwiegend um die Erhaltung des Bestandes eines isolierten Gewebes handelt und das Gewebe dabei keine Leistung zu vollbringen hat.

Wie immer es mit der Nomenklatur gehalten wird, es steht fest, daß auf Grund ausgedehnter Erfahrungen in den USA und in anderen Ländern die in vitro-Erhaltung und -Vermehrung von Gewebe auch in großem Maßstabe durchgeführt werden kann. Allerdings wird der Aufwand hierfür wesentlich höher sein als bei jedem anderen Verfahren. Über die Eigenschaften von so gezüchtetem Gewebe und das Verhalten bei parenteraler Applikation ist unabhängig von der Zellulartherapie eine beachtenswerte Literatur vorhanden, deren Auswertung jedoch den Rahmen dieses Kapitels sprengen würde.

Versuchsarbeiten, die Gewebezüchtung für Zwecke der Zellulartherapie nutzbar zu machen, das heißt das Gewebe zu «konservieren», zu vermehren und falls möglich in seiner Wirkungsintensität zu steigern, wurden 1948 auf Anregung und im Auftrag von NIEHANS von BAUER durchgeführt. Leider ist später über die Umstände und Priorität dieser Arbeiten eine unerfreuliche Polemik entstanden, die zur Aufhellung der wissenschaftlichen Grundlagen wenig beigetragen hat (BAUER 1949, 1955, HAUBOLD 1954, TIEDGE 1955). Einzelheiten über das Arbeitsverfahren zur Herstellung injektionsfähiger Gewebekulturen zur Nephritisbehandlung hat BAUER 1949 publiziert. Über die klinischen Ergebnisse bei der Injektion von Gewebe nach vitaler Konservierung spricht NIEHANS selbst nur mit knappen Worten: «Die Resultate waren gut, aber nicht besser als die mit Frischzellen.» (1954, Seite 8.) Über drei erfolgreich behandelte Patienten hat BAUER (1949) Einzelheiten berichtet.

Weitere Angaben über die klinische Anwendung von so konserviertem Gewebe im Rahmen der Zellulartherapie sind uns ebenso-

wenig bekannt geworden wie tierexperimentelle Untersuchungen darüber.

2. Konservierung durch Erhitzen

Durch Erhitzung können sowohl mikrobiell bedingte als auch enzymatisch (autolytisch) verursachte Veränderungen im Gewebe ausgeschaltet werden. Es werden jedoch hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit auch die für die therapeutische Wirkung ursächlichen Eigenschaften des Gewebes zerstört. So beschrieben schon Teir und Mitarbeiter, daß Erhitzen von Leberzellen zum Verlust der die Mitoserate der Leber steigernden Wirkung einer Leberzellinjektion führt. Systematische Untersuchungen über den Einfluß von Wärme auf die therapeutische Wirkung liegen bisher nicht vor. Einzelne Erfahrungen sprechen jedoch dafür, daß die Verhältnisse komplizierter sind als auf den ersten Blick zu erwarten ist.

3. Konservierung durch Kühlung auf Eistemperatur

Die Kühlung des Gewebes bis zur Nähe des Gefrierpunktes kann nicht als Konservierung im eigentlichen Sinne bezeichnet werden, da die autolytischen Prozesse zwar verlangsamt sind, jedoch nach wie vor ablaufen. So hat schon Niehans nach Selbstversuchen beschrieben, daß hierbei toxische Bestandteile entstehen.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Konservierungsmethoden bleibt die Lebensfähigkeit der Zellen lange erhalten. Von Lettré (1954) wurde das Überleben von embryonalem Gewebe nach verschieden langer Aufbewahrung bei +2° C bis −4° C mit Explantationsmethoden geprüft. Eine Vermehrung embryonaler Epithelzellen war noch nach acht Tagen, von Fibroblasten nach vierwöchiger Lagerung nachweisbar. Allerdings muß man bedenken, daß schon das Überleben weniger Zellen ausreicht, in der Gewebekultur zu weiterem Wachstum zu führen.

4. Konservierung durch Tiefkühlung

Eine umfangreiche wissenschaftliche Literatur spricht fast übereinstimmend dafür, daß durch Lagerung bei −30 bis −40° C mikrobielle, enzymatische und chemische Veränderungen im Gewebe praktisch vollständig unterbunden werden können. Es wird jedoch oft übersehen, daß der kritische Punkt nicht die Dauer der Lagerung und nicht die Tiefe der dem Gewebe zugemuteten Tempera-

tur ist. Kritisch sind vielmehr diejenigen Veränderungen, die sich *während* der Senkung der Temperatur im Bereich zwischen 0° und etwa –20° C im Gewebe abspielen. Genauer ausgedrückt, handelt es sich um die physikalischen und chemischen Vorgänge, die mit dem Übergang des Wassers im Gewebe vom flüssigen zum festen Aggregatzustand verbunden sind. Jedenfalls stellt das Einfrieren einen Eingriff dar, der bei ungeeigneter Durchführung das mikroskopische Bild der Gewebe grob zu verändern vermag und auch in den feineren Chemismus, besonders der Proteine, eingreifen kann. Weil von der richtigen Steuerung des Einfriervorganges viel für die Eigenschaften des Gewebes abhängt, und das Einfrieren auch der erste Schritt für die Gefriertrocknung ist, sollen die physikochemischen Vorgänge beim Einfrieren eingehender besprochen werden.

Tierisches und menschliches Weichgewebe besteht zu 60 bis etwa 90% aus Wasser. Dieses Wasser ist zum überwiegenden Teil als Hydratationswasser um elektrisch geladene Seitengruppen größerer Moleküle oder um frei bewegliche Ionen entsprechend der Dipolnatur des Wassermoleküls festgelegt (vergleiche Seite 89). Hinsichtlich des Verhaltens beim Gefrieren und Trocknen muß man das Gewebewasser darüber hinaus als verdünnte Salzlösung auffassen.

Wenn reines Wasser gefriert, ordnen sich die vorher frei beweglichen Moleküle oder Molekülgruppen zu Kristallgittern zusammen. Bei der Kristallisation wird die in flüssigem Wasser als kinetische Energie der Moleküle latent vorhandene Wärme frei. Hierdurch sind zum Gefrieren von 1 g Wasser von 0° C zu 1 g Eis von 0° C 79,5 cal/g abzuführen. Da hierfür ein gewisser Zeitraum nötig ist, erfolgt die Kristallisation nicht momentan, sondern in einer je nach dem Temperaturgefälle und der Teilchengröße der Gewebe kürzeren oder längeren Zeitspanne. In dieser Zeit ordnet sich ein zunehmend größerer Teil der Wassermoleküle um Kristallisationskeime in Raumgitterstruktur an. Außerhalb der Kristalle besteht zunächst nach wie vor Wasser in flüssiger Phase.

Bei dem Übergang flüssigen Wassers in Kristallform sind für eine Schädigung des Gewebes in erster Linie

die *Größe der Eiskristalle*,

der *Konzentrationseffekt* in der Umgebung der Eiskristalle sowie

die *Veränderungen der Dichte* (des Volumens)

verantwortlich.

a) Größe der Eiskristalle: Die Größe der Eiskristalle hängt in erster Linie von der Geschwindigkeit des Einfriervorganges ab. Wenn das Einfrieren kleinerer Gewebestückchen rasch genug erfolgt, bleiben die Eiskristalle unter der dem Lichtmikroskop gezogenen Wahrnehmungsgrenze. Im Lichtmikroskop erscheint das Zytoplasma homogen. Elektronenmikroskopisch sind Kristallgrößen von etwa 500 Å beschrieben worden (MERYMAN 1951, SJÖSTRAND 1951). Erfolgt das Einfrieren langsamer, so können die Eiskristalle zu mikroskopischen Dimensionen heranwachsen. Im extremen Fall können größere Eiskristalle eine völlige Zerstörung des Gewebeaufbaues hervorrufen (vgl. Abbildung 12 a, b).

Zur Verhinderung solcher mechanischer Veränderungen kommt es darauf an, den Temperaturbereich zwischen 0° und etwa –30° C möglichst rasch zu überwinden.

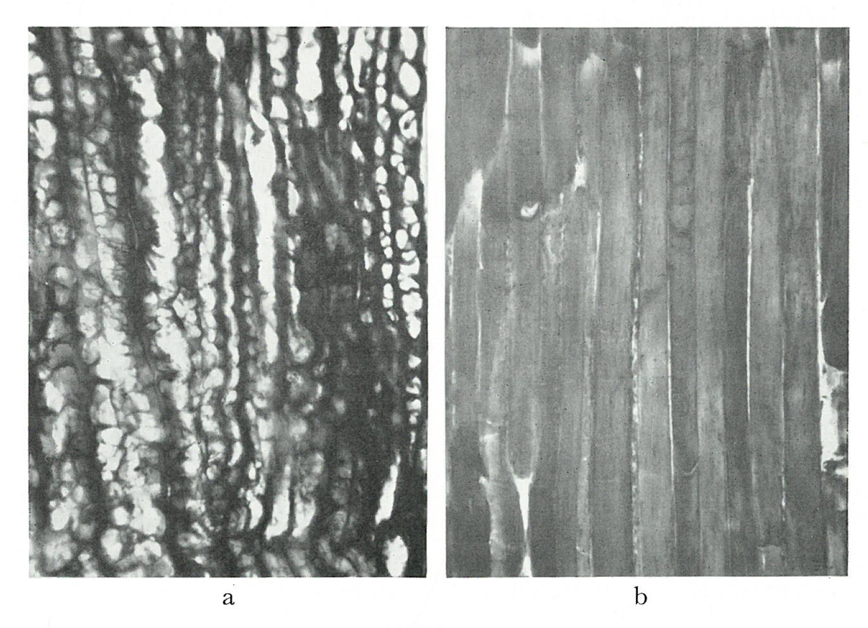


Abbildung 12

Skelettmuskulatur (Huhn) a) langsam eingefroren, dann ohne Auftauen gefriergetrocknet, mit Paraffin imprägniert und geschnitten: Große Vacuolen durch Bildung von Eiskristallen bei langsamem Einfrieren. b) Das gleiche Gewebematerial nach schnellem Einfrieren in flüssiger Luft.

b) Der Konzentrationseffekt: Wenn bei langsamem Einfrieren größere Eiskristalle heranwachsen, entziehen sie aus ihrer noch ungefrorenen Umgebung das Wasser. Es kommt somit außerhalb der Eiskristalle zu einer Konzentrationserhöhung der gelösten Bestandteile, vor allem der Salze. Es kann in dem durch Konzentrationserhöhung veränderten Milieu zur Störung des Kolloidzustandes und in extremen Fällen zu Koazervation oder Denaturierung von Eiweiß und zur Zerstörung labiler Verbindungen kommen. Außerdem senkt die erhöhte Salzkonzentration den Gefrierpunkt, wobei der in solchen Fällen schon von sich aus langsam ablaufende Erstarrungsprozeß noch weiter verzögert wird. Wie WOOD und ROSENBERG (1957) zeigten, blieben in Hefezellen bei langsamem Einfrieren bis zu 9% der im Cytoplasma enthaltenen Flüssigkeit auch bei Temperaturen bis -72° C ungefroren.

c) Veränderungen des Volumens: Unabhängig von der Einfriergeschwindigkeit treten bei Unterschreitung des Gefrierpunktes Volumenänderungen im Trockengut auf. Die nebenstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die Dichte von Wasser bzw. Eis verschiedener Temperatur. Diese Volumenänderungen können bei größeren Gewebestücken, zum Beispiel bei der Konservierung von chirurgischem Implantationsmaterial, zu Rissen führen. Bei den kleinen Gewebestückchen für die Zellulartherapie spielt dieser Vorgang keine Rolle.

Tab. 1 Dichte reinen Wassers bei verschiedener Temperatur

°C	Dichte (g·cm³)
+ 35	0,9940
+ 20	0,9982
+ 4	1,0000
0 (flüssig)	0,9998
0 (fest)	0,917
— 30	0,921
— 189	0,930

Es ist bis heute fast vollständig unbekannt, ob und in welcher Weise sich diese auf so verschiedene Weise herbeigeführten Veränderungen, die mehr oder weniger ausgeprägt wohl stets beim Einfrieren auftreten, auf das Verhalten nach der Injektion auswirken. Auch aus dem umfangreichen Erfahrungsgut bei der chirurgischen Implantation großer, durch Tiefgefrieren konservierter Gewebestücke (zum Beispiel Arterien oder Knochen) ist hierzu fast nichts zu entnehmen (Literatur siehe Seite 97f sowie NEUMANN 1961). Für das Überleben von Zellen beim Einfrieren und Wiederauftauen haben diese Vorgänge jedoch entscheidende Bedeutung. Sie sind

im letzten Jahrzehnt intensiv und mit beträchtlichem Aufwand untersucht worden und haben sich als wesentlich komplizierter erwiesen, als in diesem kurzen Referat dargelegt werden kann (vergl. zum Beispiel PARKES und SMITH 1960, REY 1959, STEPHENSON 1961).

Es ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß der Einfrierprozeß und das Lagern bei tiefer Temperatur Bakterien, Einzeller und auch Warmblüterzellen nicht abzutöten braucht. Dabei ist es heute noch offen, ob die größeren Aussichten, nach dem Wiederauftauen lebensfähige und vermehrungsfähige Zellen zu erhalten, bei sehr schnellem Einfrieren (LUYET et al. 1947, 1950, 1951) oder sehr langsamen Unterkühlen des Gewebes unter Zuhilfenahme geeigneter Schutzlösungen bestehen (vgl. NEUMANN 1955, 1957).

Da das Einfrieren des Gewebes auf tiefe Temperatur der erste Schritt zur Gefriertrocknung ist, gelten diese Darlegungen sinngemäß auch für das folgende Kapitel.

C. Gefriertrocknung

1. Definition des Verfahrens

Gefriertrocknung ist gewissermaßen die Fortsetzung der Konservierung durch Tiefgefrieren. Gefriertrocknung heißt Wasserentzug aus vorher eingefrorenem Gewebe durch Sublimation im Vacuum. Das bedeutet, daß es sich nicht wie bei der üblichen Trocknung um eine *Verdampfung* des Wassers aus flüssigem Aggregatzustand handelt, sondern um den direkten Übergang von gefrorenem Eis zu Dampf.

Synonyma für Gefriertrocknung sind: Freezing-drying, Drying by Sublimation, Congelation désiccation sowie im histologischen Schrifttum: Methode nach ALTMANN oder Methode nach ALTMANN-GERSH. Die Bezeichnung «Vacuum-Trocknung» ist abzulehnen, weil sie Verfahren einschließt, bei denen das Gewebe ungefroren bleibt.

Die Vermeidung der flüssigen Phase während der Trocknung hat ein grundsätzlich anderes Verhalten des Gewebes gegenüber dem Wasserentzug zur Folge: Statt der sonst beim Eintrocknen üblichen Schrumpfung bleibt das Gewebevolumen voll erhalten. Statt einer harten, unlöslichen, hornartigen Masse entsteht ein leichtes, poröses und zur raschen Wiederaufnahme von Wasser befähigtes Material. Anstelle der sonst unvermeidbaren Denaturierung der Pro-

teine und Veränderung der biochemischen Eigenschaften des Gewebes sind nach Gefriertrocknung und Wiederdurchfeuchtung fast alle ursprünglichen Besonderheiten des frischen Gewebes erhalten. Somit ist die Gefriertrocknung als ein ungemein schonendes Verfahren zur Konservierung von Geweben oder Gewebebestandteilen aufzufassen.

2. Anwendung der Gefriertrocknung außerhalb der Zellulartherapie

Die Gefriertrocknung von Gewebe für die Zellulartherapie stellt nur einen sehr kleinen Sektor aus dem Kreis der Anwendungsgebiete des Verfahrens dar. Da bei der Gefriertrocknung die mit Wasserentzug sonst meist zwangsläufig verbundenen chemischen und physikalischen Veränderungen fortfallen und auch der Verlust leicht flüchtiger Stoffe auf ein Minimum beschränkt ist, wird die Gefriertrocknung verwendet, um empfindliches Material biologischen Ursprungs, wie Gewebeextrakte, Viren, Bakterienkulturen, Impfstoffe, Antibiotika und empfindliche Pharmazeutika, nicht zuletzt aber auch manche Nahrungsmittel, in eine haltbare und leicht transportierbare Trockenform zu überführen. Gefriertrocknungsanlagen mit einer in Tonnen je Arbeitsgang zu bemessenden Leistung sind heute keine Seltenheit mehr (zusammenfassende Darstellungen: FLOSDORF 1949, HARRIS 1954, NEUMANN 1955, 1957, PARKES und SMITH 1961).

Die erste Anwendung der Gefriertrocknung zur Lösung einer biologischen Fragestellung erfolgte auf dem Sektor der Mikroskopie durch den Leipziger Anatomen ALTMANN im Jahre 1890.

«Läßt man frische Organstückchen gefrieren und trocknet dieselben in gefrorenem Zustand bei einer Temperatur von unter —20° C über Schwefelsäure im Vacuum vollständig aus, so erhält man in ihrem Volumen unveränderte Präparate, welche sich von dem frischen Zustand nur durch die Abwesenheit des Wassers unterscheiden, im übrigen aber sowohl in bezug auf die Formen als auch in bezug auf die Reaktionen der Elemente den frischen Zustand gewahrt haben» (ALTMANN 1890).

Wann zuerst die Gefriertrocknung von flüssigem Material durchgeführt wurde, ist schwer zu ermitteln. Das Gefrieren von Blutserum während einer gewöhnlichen Vacuumtrocknung wurde zwar häufig beschrieben (zum Beispiel SIDNEY 1896, VAN STEENBERGHE 1903), wurde aber zuerst sogar als störend betrachtet. So

ist wohl Shackell (1910) der erste, der die Gefriertrocknung systematisch benutzte. Ausgehend von den Mitteilungen Shackell's breitete sich das Verfahren als Laboratoriumsmethode bald auf weitere Anwendungsgebiete aus: Harris und Shackell (1910) begannen mit der Gefriertrocknung infektionstüchtiger Präparate von Tollwutvirus; Hammer (1911), Roger (1914) und später Swift (1921) folgten mit der Gefriertrocknung von Bakterienkulturen, deren Vermehrungsfähigkeit und pathogene Eigenschaften mehr als ein Jahrzehnt erhalten blieben. Die Gefriertrocknung von Blutplasma zu Transfusionszwecken, die Herstellung haltbarer, lyophilisierter Impfstoffpräparate, vor allem aber die Konservierung der in früheren Jahren äußerst labilen Penicillinpräparate führten den Prozeß in die Dimensionen industrieller Produktion hinein. Dies hatte zur



Abbildung 13

Blick in den sterilen Arbeitsraum vor einer Gefriertrocknungsanlage in einer pharmazeutischen Fabrik (Orion Oy, Helsinki).

Folge, daß zum Beispiel schon während des Zweiten Weltkrieges fast der gesamte Bluttransfusionsbedarf der amerikanischen Streitkräfte als gefriergetrocknetes Konserven-Plasma zur Verfügung stand.

3. Einführung der Gefriertrocknung in die Zellulartherapie

Wie NIEHANS mitteilt, ist es ihm 1949 gemeinsam mit PISCHINGER und SCHWANDER gelungen, Zellmaterial durch Gefriertrocknung zu konservieren und erfolgreich zur Wiederinjektion zu verwenden (NIEHANS 1954). Dieses Verfahren wurde bald darauf von der Firma Rhein-Chemie GmbH. in Heidelberg übernommen und in den Maßstab einer pharmazeutischen Produktion übertragen. Seitdem sind neben den «Frischzellen» (siehe vorn) gefriergetrocknete Gewebe als «Siccacell» (oder Trockenzellen) im Handel. Die weitaus überwiegende Mehrzahl der in den weiteren Kapiteln dieses Buches referierten Untersuchungen über die Zellulartherapie sind mit gefriergetrocknetem Gewebe durchgeführt worden.

Da über die Gefriertrocknung von Gewebe speziell für die Zellulartherapie nur wenige Untersuchungen veröffentlicht sind, müssen Analogieschlüsse aus Nachbarbereichen gezogen werden. Besonders wertvoll sind hier die Erfahrungen, welche bei der Gefriertrocknung und klinischen Anwendung von chirurgischem Transplantationsmaterial gesammelt wurden (siehe Seite 97f).

4. Physikalische Grundlagen der Gefriertrocknung

Gefriertrocknung heißt Entfernung von Wasser aus gefrorenem Gewebe durch Sublimation, das heißt durch direkten Übergang von Eis in Dampf unter Umgehung des flüssigen Aggregatzustandes. Die Durchführbarkeit dieses Verfahrens gründet sich im wesentlichen auf zwei physikalische Eigenschaften des Wassers:

1. Die Fähigkeit, unterhalb von 0° C und bei einem Druck unter 4,6 Torr[1] (der so definierte Punkt im Koordinatensystem wird *Tripelpunkt* genannt), vom festen Aggregatzustand unmittelbar in den gasförmigen überzugehen (Sublimation). Zum Ausgleich der höheren kinetischen Energie der Dampfmoleküle sind hierzu etwa 700 cal. für jedes Gramm sublimierten Wassers aufzubringen.

[1]) 1 Torr = 1 mm Quecksilbersäule (1 mm Hg) = 1000 Mikron. Drükke unter 1 Torr werden in steigenden negativen Zehnerpotenzen der Torreinheit angegeben; zum Beispiel 0,01 Torr = 10^{-2} Torr; 0,005 Torr = 5×10^{-3} Torr.

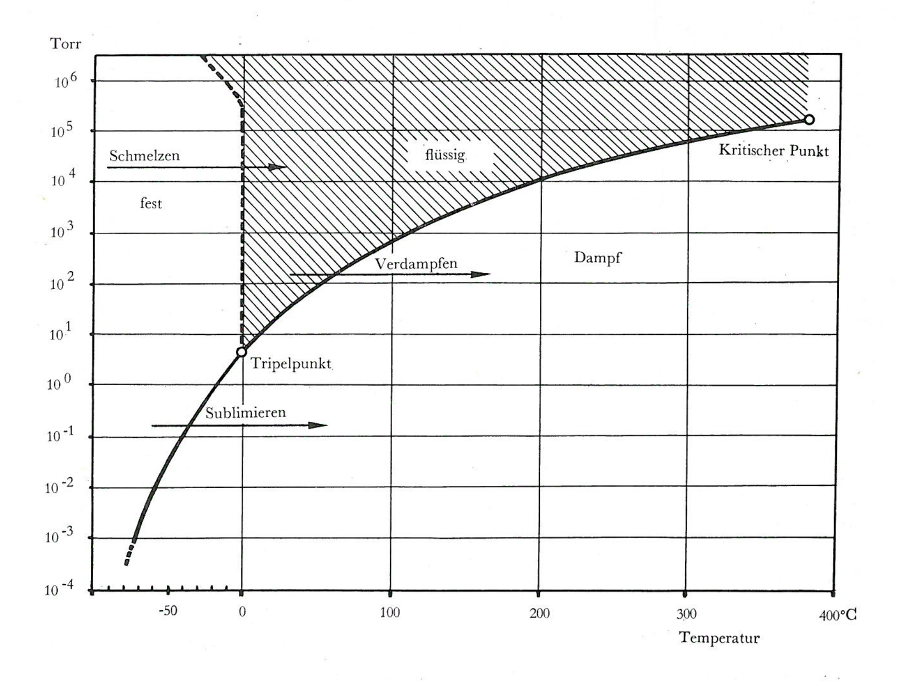


Abbildung 14

Abhängigkeit des Aggregatzustandes des Wassers von Druck und Temperatur.

2. Die Tatsache, daß aus Eis Wasserdampfmoleküle so lange in die Umgebung austreten, bis sich dort ein bestimmter Gleichgewichtsdampfdruck eingestellt hat. Die Höhe dieses Gleichgewichtsdampfdruckes oder Sattdampfdruckes hängt von der Temperatur im Eis, das heißt im Gewebe, ab (Abbildung 14).

Mit diesen Druckangaben ist nicht der *Gesamtdruck* in der Vacuumkammer gemeint, sondern immer nur die Höhe des *Partialdruckes* von Wasserdampf. An sich könnte eine Gefriertrocknung auch bei Atmosphärendruck vonstatten gehen. Allerdings setzen dann die anwesenden Luftmoleküle dem Abtransport der ausgetretenen Dampfmoleküle so großen Diffusionswiderstand entgegen, daß ein Arbeitsgang statt Stunden Wochen dauern würde.

Somit sind zur Durchführung einer Gefriertrocknung im Prinzip eigentlich nur zwei Bedingungen zu erfüllen:

1. Die Temperatur des Gewebes muß so beeinflußt werden, daß ein Auftauen sicher vermieden wird.
2. Es muß Sorge getragen werden, daß die aus dem gefrorenen Gewebe austretenden Wasserdampfmoleküle stets so weitgehend weggeschafft werden, daß die Einstellung des Sattdampfdruckes über dem Gewebe verhindert wird.

Diese beiden Regeln gelten so lange, wie noch Wasser in Form von Eis im Gewebe vorhanden ist (diese erste Phase der Gefriertrocknung wird als Haupttrocknung bezeichnet). Für die Nachtrocknung gelten andere Gesetzmäßigkeiten.

Infolgedessen besteht eine Gefriertrocknungsanlage im einfachsten Falle

1. aus einem abgeschlossenen Raum (Vacuumkammer), in welchem das zu trocknende Gewebe bei tiefer Temperatur gehalten wird, und
2. einer Vorrichtung, durch welche der aus dem Gewebe austretende Wasserdampf wirksam entfernt wird.

Daraus ergibt sich der Grundaufbau einer Gefriertrocknungsanlage. Sie besteht aus einer Trockenkammer, deren Größe sich nach der Menge des zu verarbeitenden Materials richtet. Diese Trockenkammer ist zweckmäßigerweise aus korrosionsbeständigem Material gebaut, weil Wasserdampf im Vacuum außerordentlich aggressiv ist. In die Trockenkammer sind Stellflächen eingebaut, auf die das zur Gefriertrocknung bestimmte Gewebe in Schalen oder Kölbchen aufgesetzt wird. Zum Ausgleich der bei der Trocknung entstehenden Verdunstungskälte werden diese Stellflächen während der Trocknung vorsichtig erwärmt. Bei besonders empfindlichen Substanzen kann aber auch eine Kühlung der Stellflächen notwendig sein.

Mit der Trockenkammer ist der Eiskondensator durch eine möglichst weite Öffnung verbunden. Die Kühlschlangen des Kondensators werden durch eine Kältemaschine auf Temperaturen um –40 bis –60° C gekühlt. Bei kleinen Laboranlagen kann die Kühlung auch durch Kohlensäureeis (–78° C) erfolgen. Über eine Vacuumpumpe wird das ganze System evakuiert, so daß der Dampfstrom unbehindert durch bremsende Luftmoleküle vom Trockengut zum Eiskondensator hinfließen kann.

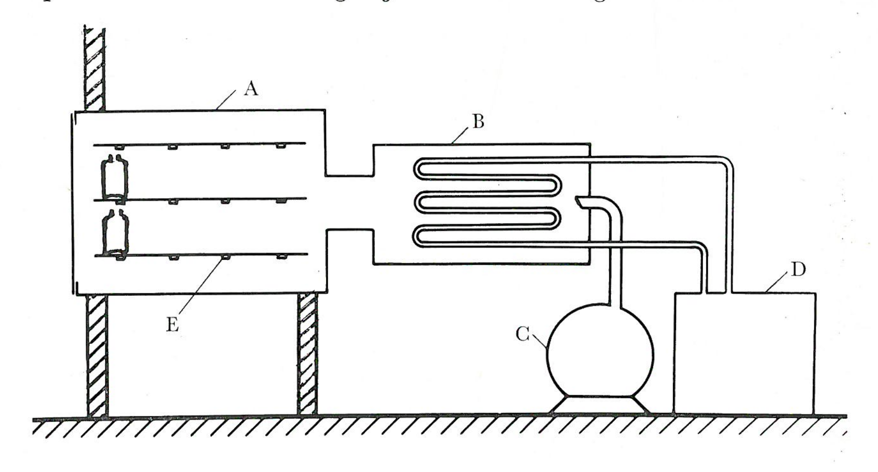


Abbildung 15
Schematische Darstellung einer Gefriertrocknungsanlage.
A = Stellflächen für das Trockengut. B = Eiskondensator. C = Vacuumpumpe.
D = Kältemaschine.

Folgende Bedingungen spielen bei der Gefriertrocknung eine Rolle:

a) Die Temperatur in der zu trocknenden Substanz: Sie wird bei der Gefriertrocknung von zwei Faktoren bestimmt: der Wärmezufuhr von außen und dem Wärmeentzug durch die Verdunstungskälte. Die Wärmemenge von etwa 672 cal. je Gramm H_2O muß zugeführt werden, wenn die Temperatur des Gewebes nicht allzu tief sinken soll. Andererseits muß die Wärmezufuhr vorsichtig erfolgen, da eine bestimmte Temperaturgrenze während der ersten Phase der Gefriertrocknung nicht überschritten werden darf.

So genügt es nicht, im Gewebe Temperaturen gerade unterhalb von 0° C einzuhalten. Es ist vielmehr erforderlich, das Gewebe für die Haupttrocknung mindestens unter –20° C, zuweilen sogar unter –50° C zu kühlen. Dies kann aus den Eigenschaften von Salzlösungen erklärt werden:

Der Gefrierpunkt einer Salzlösung sinkt mit zunehmender Konzentration bis zu einem tiefsten Wert, dem sogenannten eutektischen Punkt. Die Lage des eutektischen Punktes hängt von der Art des betreffenden Salzes ab. Er liegt zum Beispiel für Kochsalz bei –21° C, für Glukose bei –5° C. Hieraus folgt, daß auch Salzlösungen niedriger Konzentration –

wie sie im Gewebe vorliegen – wenn sie bei zunehmender Wasserverarmung des Gewebes zu höheren Konzentrationen kommen, eine beträchtliche Gefrierpunkterniedrigung und damit ein Auftauen des Materials verursachen können.

Die bei Gefriertrocknung zu beachtende Temperaturgrenze wechselt von Substanz zu Substanz und ist bis heute nur empirisch zu bestimmen. Die folgende Zusammenstellung gibt eine ungefähre Übersicht.

Blutserum	– 9 bis – 12° C
Gewebe für makroskopisch-anatomische Präparate	12 bis – 15° C
Blutplasma nach Zusatz eines Stabilisators	– 15 bis – 20° C
Penicillin (je nach Reinheitsgrad)	– 25 bis – 40° C
Streptomycin (je nach Reinheitsgrad)	– 30 bis – 40° C
Verschiedene Viruspräparate	– 30 bis – 40° C
Gewebe für histologische Untersuchungen	– 30 bis – 55° C

Die richtig dosierte Aufheizung des Trockengutes ist somit eine wichtige Bedingung für den Erfolg des Prozesses.

b) Der Wassergehalt am Ende der Trocknung: Man unterscheidet bei der Gefriertrocknung *Haupttrocknung* und *Nachtrocknung*. Die Haupttrocknung entfernt das als Eis vorhandene Wasser aus dem Gewebe. Die Nachtrocknung beginnt, sobald nur noch dünne, molekulare Filme von Wasser an der großen inneren Oberfläche des äußerlich schon ganz trocken erscheinenden Gewebes haften. Diese adsorptiv gebundene Restfeuchtigkeit wird vom Gewebe wesentlich schwerer abgegeben (Adsorptionsisothermen siehe WILLEMER 1956, NEUMANN 1957). Als Faustregel gilt, daß der Feuchtigkeitsgehalt des Gewebes am Ende der Trocknung 0,5 bis 1,0% nicht überschreiten darf, wenn eine genügend lange Lagerungsfähigkeit des Gewebes gewährleistet sein soll.

D. Eigenschaften von Gewebe nach Gefriertrocknung

Die Anwendung der Gefriertrocknung für die Zellulartherapie dient dem Ziel, gefriergetrocknetes Gewebe längere Zeit lagern zu können und es später durch einfaches Zufügen von Wasser in eine Zustandsform mit den Eigenschaften von frisch aus dem Spenderorganismus gewonnenem Gewebe zurückzuverwandeln, ohne daß dabei therapeutische Eigenschaften des Gewebes verlorengehen dürfen.

Ob dieses Ziel erreicht wird, kann durch direkte Beweise (zum Beispiel die zweifelsfreie Beobachtung therapeutischer Wirksamkeit) sowie durch indirekte Argumente (Erhaltung der für die Wirkung wesentlichen Eigenschaften des frischen Gewebes) dargetan werden.

1. Eigenschaften des Trockengewebes

Gefriergetrocknete Gewebestückchen sind leicht, ungeschrumpft und meist uncharakteristisch gelblich-grau gefärbt. Sie sind spröde und verhältnismäßig fest, solange sie aus der Luft keine Feuchtigkeit angenommen haben. Bleiben sie an der Luft liegen, so werden sie weich und lassen sich leicht zusammendrücken. An der Luft steigt ihre Restfeuchtigkeit von 0,5 bis 1 % je nach der Art des Gewebes, der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur auf 10–15 %, zuweilen sogar bis 25 % an. Die Feuchtigkeitsaufnahme aus der Luft wird erst nach mehreren Minuten erkennbar. Die Durchtränkung mit Wasser oder Ringerlösung erfordert nur wenige Sekunden.

Das Gewebeeiweiß bleibt nach Gefriertrocknung undenaturiert (vergleiche folgende Kapitel). Trockenes, undenaturiertes Eiweiß zeigt einige interessante Eigenschaften, über die bisher wenig bekannt war, da bei den bisher gebräuchlichen Trocknungsverfahren fast stets von vornherein eine Denaturierung des Eiweisses eintrat.

Während bei der Erhitzung von frischem, wasserhaltigem Gewebe oberhalb von etwa 45–50° C Hitzedenaturierung einsetzt, ist gefriergetrocknetes Eiweiß bemerkenswert hitzeresistent. Erhitzt man zum Beispiel ein gefriergetrocknetes Fermentpräparat, eine Bakterienkultur oder eine als Antigen oder Antikörper wirksame Substanz und prüft anschließend diese Proben auf Verlust oder Herabsetzung der an das Eiweiß gebundenen Funktion, so findet man eine Schädigung erst bei Temperaturen weit oberhalb der Grenze, bei der wasserhaltiges Eiweiß sonst denaturiert. Dabei besteht eine enge Beziehung zwischen Restfeuchtigkeit und Thermoresistenz.

Von NEUMANN (1954) sind Untersuchungen an einem Thrombokinase-Extrakt durchgeführt worden. Die dabei beobachtete Temperaturresistenz erlaubt bei Präparaten mit niedriger Restfeuchtigkeit eine Erhitzung bis etwa 110° C. Diese Beobachtung wurde an histologischen Präparaten nachgeprüft und bestätigt, indem die Aktivität der alkalischen Phosphatase nach Erhitzung des trockenen Gewebes als Test ver-

wendet wurde. Auch gegen die Schädigung durch ultraviolette Strahlung ist gefriergetrocknetes Gewebe widerstandsfähiger als frisches oder wiederdurchfeuchtetes Gewebe (Neumann 1954, 1957).

Um eine Schädigung durch Luftsauerstoff zu vermeiden, wird das für die Zellulartherapie bestimmte Gewebe nach der Gefriertrocknung in Ampullen aufbewahrt, die vor dem Zuschmelzen evakuiert worden sind.

2. Erhaltung der Struktur des Gewebes

Eines der ältesten Anwendungsgebiete der Gefriertrocknung ist die Erhaltung der mikroskopischen Struktur zum Zwecke der histologischen Untersuchung (Altmann 1890). So überrascht es sehr, wenn Bauer (1954) bei der mikroskopischen Analyse von Trockenzellen «entweder überhaupt keine sichtbaren Strukturen von Bedeutung oder aber ... alle möglichen Sorten malträtierter, schattenhafter Gebilde (wahrnimmt), die noch gewisse Spuren ihrer zellu-

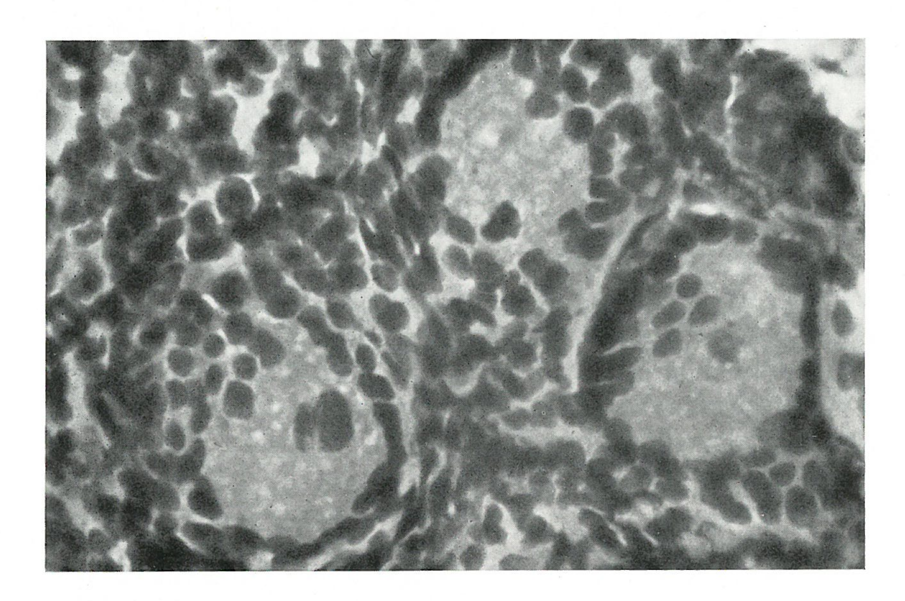


Abbildung 16
Ausschnitt aus einem histologischen Präparat von gefriergetrocknetem Gewebe zur Zellulartherapie, «Siccacell-Ovar total (Schwein)». Haematoxylin-Eosin. Vergr. 620fach.

lären Vergangenheit aufweisen». Wir haben selber zahlreiche Siccacell-Präparate mikroskopisch untersuchen können und dabei neben Bereichen, die durch Eiskristallbildung beim Einfrieren große Vacuolen und Zerreißungen aufwiesen, auch sehr viele Stellen gefunden, die strukturmäßig einwandfreien histologischen Präparaten an die Seite zu stellen waren (vergleiche Abbildung 16).

Voraussetzung für die Gewinnung einwandfreier mikroskopischer Präparate ist allerdings eine zweckentsprechende histologische Vorbehandlung des zu untersuchenden Gewebes. Da nach Gefriertrocknung Eiweiß löslich bleibt, und die Zellen bei raschem Eindringen von Wasser in der Tat leicht artefizielle Veränderungen erfahren, ist es am besten, das zu untersuchende Gewebe aus der Ampulle unmittelbar in flüssiges Paraffin zu bringen, nach dem Schneiden auf trockene Objektträger aufzuziehen und vor der Färbung in 96%igem und dann 70%igem Alkohol zu fixieren. (Weitere Arbeitsmethoden und Literatur siehe NEUMANN 1958).

Weitere Abbildungen, welche die Erhaltung der Struktur in für therapeutische Zwecke gefriergetrocknetem Gewebe deutlich machen, finden sich zum Beispiel in der Monographie von NIEHANS (1954). Eine Aufzählung der zahllosen histologischen Untersuchungen an gefriergetrocknetem Gewebe der verschiedensten Organe würde über den Rahmen dieses Kapitels bei weitem hinausgehen.

Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden an gefriergetrockneten Geweben durchgeführt (WYCKOFF 1946, 1954, SJÖSTRAND 1951). Kritische Bemerkungen stammen von BRETSCHNEIDER und ELBERS (1952) sowie von WILLIAMS (1952 a, b, 1953). Bei dem starken Vergrößerungsvermögen des Elektronenmikroskopes spielt die Bildung submikroskopischer Eiskristalle eine störende Rolle. Allerdings wurde beobachtet, daß die durch Eiskristalle im trockenen Gewebe hervorgerufenen Vacuolen bei der Wiederdurchfeuchtung wieder zuquellen können (vergleiche MAYERSBACH 1958 u. a.).

3. Erhaltung der Proteine in undenaturiertem Zustand

Der Grund für die Sonderstellung der Gefriertrocknung ist das Ausbleiben einer irreversiblen Denaturierung der Eiweißkörper. Die Diskussion, ob Gefriertrocknung nicht doch zu einer partiellen oder reversiblen Eiweißdenaturierung führt, leidet unter dem Mangel

a) $R \cdot CHNH_2 \cdot COOH$

b)

RCH – NH_2 basisch
RCH – $CO \vdots OH$ sauer

RCH – N – $H \vdots H$ basisch
RCH – $COOH$ sauer

c)

NH – RCH – CO – NH – CHR – CO – NH – RCH – CO

ca. 7 Å

ca. 3,5 Å

Abbildung 17

Strukturchemie von Eiweißmolekülen. a) Aminosäure, b) Prinzip der Verbindung von Aminosäuren zu Eiweißketten, c) Schema einer Polypeptidkette.

einer gültigen und experimentell reproduzierbaren Definition des Begriffes der «Eiweißdenaturierung» (NETTER 1957).

Es spricht sehr vieles dafür, daß die spezifische Wirkung von Gewebeinjektionen auf der parenteralen Applikation von organspezifischem Eiweiß beruht (vergleiche die folgenden Artikel in dieser Monographie). Das Erhaltenbleiben der Proteine unter dem Einfluß der Gefriertrocknung verdient somit zu Recht eine ausführliche Betrachtung:

Eiweißmoleküle sind Ketten von Aminosäuren. Dies bringt es mit sich, daß das Molekül basisch und sauer reagierende Seitenketten hat, die ihrer Natur entsprechend elektrisch positiv bzw. negativ aufgeladen sind (vergleiche Abbildung 17).

Entsprechend dem Überwiegen basischer oder saurer Gruppen sind die Eiweißteilchen überwiegend positiv oder negativ geladen. Entgegengesetzt geladene Eiweißkörper würden miteinander verklumpen und auf diese Weise Koagulation und Unlöslichkeit der Proteine herbeiführen, wenn nicht das in lebendem Eiweiß stets reichlich vorhandene Wasser eine Schutzfunktion ausüben würde.

Das Wassermolekül ist als Dipol aufzufassen, das heißt die elektrisch positiven Wasserstoffatome wirken mehr auf der einen, das elektrisch negative Sauerstoffatom mehr auf der anderen Seite des Moleküls. Dies hat zur Folge, daß um ein undenaturiertes Eiweißmolekül ein Hydratationsmantel (Solvathülle) besteht, der die Annäherung ungleichnamig geladener Kolloidteilchen verhindert und Eiweiß im Solzustand erhält, wäh-

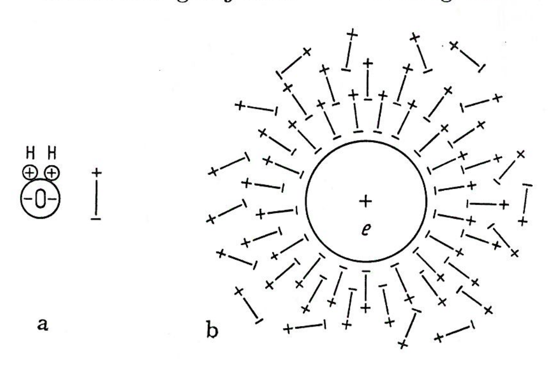


Abbildung 18
a) Molekülschema des Wassers und schematische Darstellung des Dipolcharakters,
b) Hydratationsmantel um ein geladenes Kolloidteilchen, zum Beispiel ein Eiweiß-molekül (nach Pallmann 1931).

rend eine gegenseitige Anziehung mit Koagulation und Denaturierung der Proteinmoleküle erfolgen würde, wenn die Hydratationshülle zum Fortfall käme (Abbildung 18).

Die praktische Erfahrung bestätigt dies: Eiweißmoleküle verlieren ihre überwiegend positive oder negative Aufladung beim pH ihres isoelektrischen Punktes. Der schützende Hydratationsmantel löst sich auf. Eiweiß am isoelektrischen Punkt ist äußerst labil und koaguliert häufig. Auch dissoziierende Salze reißen in Eiweißlösungen das Hydratationswasser an sich und bringen die Proteine zur Ausfällung. Das fraktionierte «Aussalzen» von Eiweißkörpern geht hierauf zurück. Die probateste Methode schließlich, Eiweißkörper zur Denaturierung zu bringen, ist der Wasserentzug während des normalen Trocknungsvorganges. Mit der Entfernung der Hydratationshülle lagern sich die Eiweißketten dichter aneinander, und über verschiedene zunächst noch reversible Zwischenstufen kommt es schließlich zur irreversiblen Ausfällung (vergleiche Abbildung 19).

So entsteht bei der normalen Trocknung aus dem frischen Gewebe ein hartes, hornartiges Produkt, das Wasser nicht oder nur langsam aufnimmt und auch dann mit dem ursprünglichen Gewebe nicht mehr vergleichbar ist. Im Gegensatz dazu nimmt gefriergetrocknetes Gewebe Wasser in Sekunden auf und ist danach vom frischen Gewebe praktisch nicht mehr zu unterscheiden.

Der Grund für die Sonderstellung der Gefriertrocknung ist aus den vorangegangenen Ausführungen gut zu erkennen. Solange das Gewebe noch Wasser enthält, liegt dieses bei der Gefriertrocknung tiefgefroren in erstarrter Form vor und macht Verklumpung oder

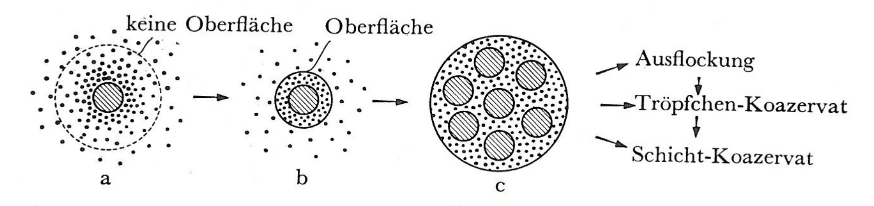


Abbildung 19

Fortschreitende Dehydratation von Kolloidteilchen; a) diffuser Hydratationsmantel, b) konkreter Hydratationsmantel, c) beginnende Koazervation, die schließlich zur Ausflockung und irreversiblen Denaturierung der Proteine führt (aus Frey-Wyssling 1938).

Koagulieren der Eiweißketten gegeneinander rein mechanisch unmöglich. Da bei der Gefriertrocknung das Auftreten einer flüssigen Phase überhaupt unterbleibt und der Übergang von Eis in Wasserdampf unmittelbar durch Sublimation erfolgt, besteht für die Eiweißketten auch in der schon getrockneten Zone des Präparates keine Möglichkeit, sich gegeneinander zu verschieben, da offenbar die Anwesenheit von Wasser für spontane Formveränderungen der Eiweißmoleküle unentbehrlich ist.

Eindrucksvolle Hinweise für das Erhaltenbleiben der Eiweißkörper in nativem Zustand liefern *elektrophoretische Untersuchungen.* Sager (1947) konnte zeigen, daß die Proteine der Frauenmilch zwar durch Erhitzen, nicht aber durch Gefriertrocknung in ihrem elektrophoretischen Verhalten verändert werden. Entsprechende Ergebnisse fand Monroy (1950) bei Untersuchungen am Eiweiß von Seeigel-Eiern.

Lösliche Eiweißkörper bleiben auch nach Gefriertrocknung *wasserlöslich.* Der leichten Lösungsfähigkeit von sonst nach Trocknung unlöslichen Stoffen verdankt die Gefriertrocknung die Bezeichnung *Lyophilisation.* Die Herstellung jahrelang haltbarer Blutplasmakonserven durch Gefriertrocknung wäre nicht möglich, wenn es zur Eiweißdenaturierung käme (Flosdorf und Mudd 1942, Greaves 1946, Strumia, McGraw und Heggestad 1952).

Eine Ausnahme scheint allerdings für einige Lipoproteide des Blutplasmas zu bestehen, deren Löslichkeit nach Gefriertrocknung infolge einer partiellen Lösung der Bindung zwischen α_1- sowie γ_1-Globulin und dem Lipoidkörper beeinträchtigt ist (Cohn 1945,

Gurd et al. 1949). Auch für einzelne Globulin-Fraktionen ist eine Abnahme der Löslichkeit nach Gefriertrocknung beobachtet worden (Masucci, Lahiri 1947), wobei allerdings weder über die Bedingungen des Einfrierens noch der Trocknung nähere Angaben vorliegen. Feinere Veränderungen im Verhalten gefriergetrockneter Proteine wurden von Mirsky (1936) und Paulig (1936) sowie Lindvall und Carsjö (1950) beschrieben. Sie finden nach bloßem Einfrieren und Auftauen von Seeigel-Eiern nur 50% des Gesamtproteins löslich, nach Gefriertrocknung jedoch 85%. Beiträge über die Erhaltung der Eigenschaften gefriergetrockneter Proteine liefert auch die Allergie-Forschung (Forrester und Langner 1939, Flosdorf et al. 1940, Spielmann und Schulz 1951, 1952, sowie Bergmann und Schenker 1954).

4. Erhaltung von Enzymen und Reaktionsketten im Gewebe

Ein besonders geeignetes Objekt zum Studium der Beeinflussung von Proteinen durch die Gefriertrocknung sind die Fermente, bei denen der größte Teil des Moleküls (das sogenannte Apoferment) aus Eiweiß besteht. Bei den meisten Enzymen bleibt die Aktivität nach der Gefriertrocknung praktisch unverändert hoch. Bei einigen wurden Aktivitätseinbußen festgestellt:

Anfinsen, Lowry und Hastings (1942) fanden in der Netzhaut die Aktivität der *Cholinesterase* gegenüber Frischgewebe unverändert. Bei der *Peptidase* sahen sie eine Aktivitätsminderung um 10%. Doyle (1955) konnte zeigen, daß durch Gefriertrocknung allein keine Verminderung der *Peptidaseaktivität* zustande kommt. Doyle (1948) sowie Berenbom (1952) sahen nach Gefriertrocknung nur eine minimale Aktivitätsminderung der alkalischen und der sauren *Phosphatase* und nur eine mäßige Herabsetzung der *Succino-Dehydrogenase*-Aktivität. Vergleichende histochemische Untersuchungen von Yokoyama und Stowell (1951) zeigten die Erhaltung von alkalischer und saurer *Phosphatase*, *Phosphoamidase* und *Esterase*. Entsprechende Untersuchungen mit quantitativer Methodik wurden von Yokoyama, Berenbom und Doyle (1953) für alkalische und saure *Phosphatase*, für *Esterase*, *Succino-Dehydrogenase* und *Cytochrom-Oxydase* durchgeführt. Der Prozeß des Einfrierens führte bei alkalischer und saurer *Phosphatase* sowie *Esterase* nur zu einer geringfügigen Aktivitätsminderung. Jedoch hatte das Einfrieren einen Aktivitätsverlust von 50% bei der *Succino-Dehydrogenase* und von 60% bei der *Cytochrom-Oxydase* zur Folge. Von Naidoo und Pratt (1956) wurde die Phosphatase-Aktivität in gefriergetrocknetem Gewebe gleich hoch wie

in unbehandeltem Gewebe, in einzelnen Fällen sogar etwas höher gefunden. Ähnliche Untersuchungen mit entsprechendem Ergebnis stammen von STAFFORD und ATKINSON (1948), NEUMANN (1952), REALE (1957) und vielen anderen. Auf die gute thermische Stabilität von Fermenten in gefriergetrocknetem Gewebe hat NEUMANN (1957) aufmerksam gemacht.

Vergleichende Untersuchungen über den *Sauerstoffverbrauch frischer und gefriergetrockneter Gewebeschnitte*, das heißt über das Erhaltenbleiben ganzer Reaktionsketten, stammen von KUHN und KNÜCHEL (1954). Im Warburg-Apparat wurde der O_2-Verbrauch von Leberschnitten unmittelbar nach der Tötung der Tiere mit dem O_2-Verbrauch von Gewebe verglichen, welches zwei Tage bei −10 bis −20° C gefroren gehalten wurde oder verschieden lange Zeit in getrocknetem Zustand gelagert hatte. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2

Rattenleberschnitte in:

	Ringer + Dextrose	Ringer + Laevulose	Ringer + Na-Citrat
frisch	100 %	100 %	100 %
2 Tage gefroren	34 %	37 %	31 %
2 Tage getrocknet	7 %	16 %	10 %
Niehans-Leber	5 %	7 %	6 %

O_2-Aufnahme von frischen, gefrorenen und getrockneten Leberschnitten im Vergleich zu Niehans-Leber. Die O_2-Aufnahme wurde auf gleiche Menge Trockengewicht der Gewebe umgerechnet und auf diejenige der frischen Gewebe = 100% bezogen. (Aus Kuhn und Knüchel)

Diese Versuchsergebnisse scheinen in der Tat für eine beträchtliche Verringerung der Aktivität der sauerstoffübertragenden Enzyme zu sprechen. Doch betont schon LETTRÉ (1954), daß die Aktivitätsminderung der sauerstoffübertragenden Fermente nur eine scheinbare ist und aus den in vitro-Bedingungen der Untersuchungen erklärt werden kann. Dies scheint völlig plausibel, wenn man sich vor Augen hält, daß die Sauerstoffübertragung im Gewebe über eine große Anzahl einzelner Reaktionsschritte verläuft, von denen fast jeder durch ein eigenes, spezifisches Enzym gesteuert wird. Man-

che dieser Enzyme werden durch eine Anhäufung ihrer eigenen Reaktionsprodukte inaktiviert (darauf beruht die Selbststeuerung vieler Lebensprozesse). Es ist nun leicht vorstellbar, daß der in vivo rasch vonstatten gehende Abtransport dieser Reaktionsprodukte in gefrorenem Gewebe und nach Gefriertrocknung unterbrochen ist, so daß es zu einer temporären Blockade einzelner Glieder und damit der ganzen Reaktionskette kommt, ohne daß den Enzymen selbst ein irreversibler Schaden geschehen ist. Es erscheint durchaus fraglich, ob aus der Höhe der Sauerstoffübertragung in vitro ohne weiteres auf eine Beeinflussung des Enzymgehaltes im Gewebe geschlossen werden darf.

5. Untersuchung anderer Verbindungen nach Gefriertrocknung

LETTRÉ (1954) konnte zeigen, daß die im lebenden Gewebe vorhandenen, energiereichen *Triphosphat-Verbindungen* bei sofortigem Einfrieren mit flüssiger Luft erhalten bleiben, daß sie jedoch abgebaut werden, wenn das Organ zum Beispiel erst 20 Minuten nach der Tötung aus dem Spendertier entnommen wird. Bei sofortigem Einfrieren und Gefriertrocknen bleiben die Triphosphat-Verbindungen dann auch bei längerem Lagern des Gewebes unverändert erhalten.

Für das Erhaltenbleiben der *Nucleinsäuren* sprechen zahlreiche Beobachtungen (GERSH 1932, BENSLEY und GERSH 1933, HOERR 1936, JULÉN, SNELLMANN und SYLVÉN 1950, 1951 a, b). Über den Nachweis von *Ascorbinsäure* hat 1952 GOMORI berichtet; ERÄNKÖ (1954) hat die Erhaltung von Ascorbinsäure in gefriergetrockneten Nebennieren bestätigt.

Von GERSH (1932) stammen Angaben über den *Harnsäurenachweis* in gefriergetrockneten Gewebestücken. *Harnstoff* wurde von COPELAND (1951) in gefriergetrocknetem Gewebe nachgewiesen. Die Erhaltung von Verbindungen mit *Eigenfluoreszenz* ist von DE LERMA (1958) und von MAYERSBACH (1958) ausführlich abgehandelt worden. Angaben über den ortsrichtigen Nachweis *intravital injizierter Farbstoffe* in gefriergetrocknetem Gewebe stammen von GERSH (1950) und ROLLHÄUSER (1957).

Auch über *anorganische Verbindungen* liegen zahlreiche Untersuchungen vor: Untersuchungen über den histochemischen Nachweis von Magnesium und Calcium nach Gefriertrocknung wurden von

Scott und Packer (1939) durchgeführt. Angaben über den Nachweis von Calcium und Kalium sowie von Chloriden finden sich bei Gersh (1938). Der Nachweis von Ferrocyanid in gefriergetrocknetem Gewebe ist von Gersh (1932) sowie Gersh und Stieglitz (1934) durchgeführt worden.

Von Pease wurde beobachtet, daß nach der Gefriertrocknung von *Myosin in einer Lösung von Kaliumchlorid* nach Beendigung der Trocknung freies Kaliumchlorid elektronenmikroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Trotz der sehr niedrigen Trocknungstemperatur von −72° C glaubte Pease, daß während der Entwässerung das ionisierte Salz durch Verdampfen verschwunden ist. Von Neumann (1954) wurde unter Verwendung radioaktiver Indikatoren nachgeprüft, ob bei der Gefriertrocknung mit einem Verlust anorganischer Salze zu rechnen ist. Während aus wäßrigen Lösungen bei einer Trocknungstemperatur von −30° C in der Tat einige Prozent eines in geringer Konzentration vorhandenen Salzes durch den Dampfstrom mitgerissen werden können, unterbleibt dies sofort, wenn entweder die Trocknungstemperatur herabgesetzt wird oder großmolekulare Stoffe, wie zum Beispiel Gelatine oder Blutserum, der wäßrigen Lösung zugesetzt werden. Hierzu genügen bereits sehr geringe Konzentrationen. Aus Gewebe oder Blutplasma geht radioaktives Sulfat oder Jodid während der Gefriertrocknung nicht verloren.

Eine Mitteilung von Patat und Hartmann (1957) zeigt, daß der Einfrierprozeß und die Gefriertrocknung den *Ordnungszustand von Fadenmolekülen* offenbar nicht zu beeinflussen vermögen. Auch nach Gefriertrocknung reiner Salzlösungen ohne Zusatz großmolekularer Verbindungen bleiben ungeschrumpfte, lockere Kristallgerüste zurück. Die Mitteilung von Butler und Bell (1933), daß menschliches Organgewebe, welches erst längere Zeit post mortem entnommen wurde, zur Gefriertrocknung eine wesentlich längere Zeitspanne benötigt als frisches Gewebe, ist bisher nicht bestätigt worden. Über vergleichende histochemische Untersuchungen an gefriergetrocknetem Gewebe wird auch von Schmid in diesem Buch berichtet (Seite 126).

Alles in allem ist festzustellen, daß der Bestand an chemischen Stoffen im Gewebe – abgesehen vom Wasser – durch die Gefriertrocknung nicht oder nur unwesentlich verändert wird. So überrascht es nur wenig, daß bei niederen Organismen auch die Gesamtheit der Stoffwechselvorgänge, welche das Leben in seiner elemen-

taren Form ausmachen, Gefriertrocknung und langjährige Lagerung überstehen können.

6. Erhaltung der Lebensfähigkeit

Seit den Anfängen der Gefriertrocknung ist bekannt, daß sich *Bakterienkulturen* einfrieren und trocknen lassen und nach Wiederdurchfeuchtung weiterwachsen, ohne in ihren Eigenschaften von den frischen Mikroben unterscheidbar zu sein. Es stirbt zwar bei der Prozedur ein gewisser Prozentsatz an Keimen ab, und zwar die meisten bereits beim Einfrieren. Die Überlebensrate kann aber bei geeigneten Gefriertrocknungsbedingungen dicht an 100% herankommen. Zahlreiche Bakterien-, Phagen- und Virusstämme sind gefriergetrocknet worden, ohne daß Veränderungen der pathogenen Eigenschaften auftraten (Hammer 1911, Proom 1951, Fry und Greaves 1951). Auch die Gefriertrocknung von Hefezellen ist möglich.

Jedenfalls zeigen diese Ergebnisse, daß zumindest einfache Lebenssysteme durch die Gefriertrocknung in keinem Glied ihrer Stoffwechselkette so geschädigt werden, daß die Wiederaufnahme der Lebensprozesse nach Wiederzugabe von Wasser prinzipiell unterbrochen wäre.

Daß dagegen Gewebe mehrzelliger Organismen nach Gefriertrocknung nicht mehr überleben, scheint heute festzustehen, nachdem anfänglich die Ansichten über diesen Punkt geteilt waren (Hirschberg und Rusch 1950, Dmochowski und Millard 1950). Isolierte Warmblütlerzellen – Spermatozoen, Erythrocyten, Asciteszellen – haben jedoch nach Anwendung besonderer Methoden des Einfrierens die Gefriertrocknung überlebt (vergleiche Lovelock 1960, Rey 1960, Parkes und Smith 1960). Es spricht vieles dafür, daß der Verlust der Überlebensfähigkeit auf eine Schädigung der intrazellulären semipermeablen Membranen zurückzuführen ist, die wahrscheinlich bereits während des Einfrierens erfolgt.

Experimentell wurde das Überleben von «Trockenzellen» für die Zellulartherapie mit Gewebezüchtungsmethoden durch Lettré (1954) geprüft und verneint. Peter hat angeregt, das Überleben oder Absterben der zu injizierenden Zellverbände mit den Methoden der Fluoreszenzmikroskopie festzustellen, wie sie zum Beispiel unter Verwendung von Acridinorange durch Strugger beschrie-

ben worden sind. Doch liegen Untersuchungsergebnisse darüber bisher nicht vor.

Während in den Anfängen der Zellulartherapie das Überleben des injizierten Zellmaterials als wichtige Voraussetzung für die therapeutische Wirksamkeit angesehen wurde, weiß man heute, daß das Überleben des injizierten Gewebes bedeutungslos für die Wirkung ist. Es wird im Gegenteil als beruhigend empfunden, keine Gefahr zu laufen, beim «Angehen» implantierter «Frischzellen» unerwünschte Reaktionen mit den für das Implantat antigenen Zellen des Wirtes zu erhalten, wie sie als «graft-against-host reaction» zum Beispiel von MERRILL (1959) beschrieben worden sind.

7. *Anwendung von gefriergetrocknetem Gewebe in der Chirurgie*

Die Aufgabe der Gefriertrocknung, das labile System reaktiver Stoffe im Gewebe für Monate oder Jahre in eine Dauerform zu bringen, aus welcher es bei Bedarf schnell in den ursprünglichen Zustand zurückgeführt werden kann, besteht bei der Transplantationschirurgie in besonderem Maße. Zur Bewältigung dieser speziellen Aufgabe wurden besondere Gewebebanken geschaffen, in denen die Gefriertrocknung neben der einfachen Tiefkühlung eine bevorzugte Stellung einnimmt.

Die älteste und auch heute noch häufigste Anwendung der Gefriertrocknung für Transplantationszwecke betrifft «flüssiges Gewebe», das heißt Blutplasma. Seit etwa 1935 wurde gefriergetrocknetes Blutplasma zuerst in den USA und in England verwendet. Nach FLOSDORF (1948) wurden während des Zweiten Weltkrieges nicht weniger als 7,59 Millionen Liter Blut zu 8,3 Millionen Einheiten Trockenplasma verarbeitet. In zahlreichen klinischen und laboratoriumsmäßigen Veröffentlichungen ist über die Verträglichkeit der Injektion derartig konservierten Plasmas berichtet worden, teilweise nach mehr als siebenjähriger Lagerung der getrockneten Präparate (STRUMIA, MCGRAW und HEGGESTAD 1952, HILL und MUIRHEAD 1942, GREAVES 1946 und zahlreiche andere). Träten hier unter der Gefriertrocknung oder der nachfolgenden Lagerung Zerstörungen oder tiefer greifende Veränderungen gegenüber dem frischen Plasma ein, so würde dies an gehäuften Transfusionszwischenfällen erkennbar sein.

Die Anwendung der Gefriertrocknung zur Konservierung fester Gewebe ist jüngeren Datums. Die folgenden Hinweise erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit und lassen insbesondere zahlreiche neuere, vorzugsweise klinische Arbeiten unerwähnt.

Nach HYATT (1960) sind in einer *Gewebebank* in den USA in den Jahren 1950 bis 1958 etwa 1500 Knochenkonserven und mehr als 500 Konserven von weichen Geweben (Arterien, Haut, Knorpel, Faszie) durch Gefriertrocknung in lagerfähige Form gebracht worden. Der «ideale Spender» (homo sapiens) vermag bei geeigneter Präparation bis zu 88 Stücke Gewebekonserve zu liefern. Hierbei stehen Knochengewebe, Haut und Knorpel im Vordergrund. Darüberhinaus werden Fascie, Dura und Arterien gewonnen.

Die größte praktische Bedeutung hat die Gefriertrocknung von *Knochenkonserven*. Grundlegende Untersuchungen über die Implantation von gefriergetrockneten Knochen im Tierversuch stammen von KREUZ, HYATT und TURNER (1951). Sie setzten bei 44 Hunden ein etwa 6 cm langes und 1 cm breites Knochenstück in den Schaft des Radius ein und kontrollierten zwischen dem 8. und 200. Tag nach der Operation die Gewebereaktionen um das Implantat. Im wesentlichen waren die Reaktionen des Organismus die gleichen wie bei der Implantation von frischem, nicht gefriergetrocknetem Knochengewebe gleicher Herkunft. (Vergleiche hierzu auch HYATT, TURNER und BASSETT 1950; KREUZ, HYATT, TURNER und BASSETT 1951, 1952; FLOSDORF und HYATT 1952; PATE und SAWYER 1952).

Über klinische Erfahrungen mit gefriergetrockneten Knochen berichteten als erste KREUZ, HYATT, TURNER und BASSETT (1951) sowie FLOSDORF und HYATT (1952). Weitere Arbeiten stammen von RITTER (1956), TURNER et al. (1956), BASSETT et al. (1956) und zahlreichen weiteren Autoren.

Die ersten Transplantationen von gefriergetrockneten *Hautstückchen* wurden 1944 von WEBSTER durchgeführt. Weitere grundlegende Untersuchungen stammen von BILLINGHAM und MEDAWAR (1955). Das Anwendungsgebiet gefriergetrockneter Hautkonserven wird hauptsächlich in der Behandlung schwerer Verbrennungen gesehen. Nach dem Zahlenmaterial von HYATT (1960) ist die initiale Anheilungsquote mit durchschnittlich 80% bei gefriergetrockneter Haut besser als nach Konservierung mit anderen Methoden. Da gefriergetrocknetes, heterologes Gewebe oft reaktionslos transplantiert

werden konnte, ist wiederholt diskutiert worden, ob durch den Vorgang der Gefriertrocknung eine Art Despezifizierung des artfremden Eiweißes erfolgt.

Die Gefriertrocknung von *Arterientransplantaten* ist intensiv experimentell erprobt worden (vergleiche HUFNAGEL und EASTCOTT 1952; HUFNAGEL 1952; PATE und SAWYER 1953 u. a.). Die ersten Implantationen gefriergetrockneter Arterien beim Menschen wurden von BROWN und HUFNAGEL (1953) vorgenommen. Weitere Mitteilungen geben CRAWFORD et al. (1956) sowie CREECH et al. (1956). Von SEWELL, BATCHELOR und KUTH (1954) ist das Bestehenbleiben elastischer Fasern in gefriergetrockneten Arterien-Homotransplantaten beim Hund bis zu 6 Monaten nach der Transplantation beobachtet worden.

Die Verwendung von gefriergetrockneter Faszie wurde von SNYDERMAN (1957) bisher vor allem bei der chirurgischen Behandlung von Hernien, bei kosmetischen Operationen sowie bei Radikaloperationen der Mamma erprobt. Über die Anwendung gefriergetrockneter Faszien zur Deckung der Abdominalhernien im Tierversuch haben SEWELL et al. (1955) berichtet. Auch die Gefriertrocknung der *Cornea* ist als hochspezialisiertes Anwendungsgebiet der Gefriertrocknung zu erwähnen. Wesentliche Untersuchungen auf diesem Gebiet stammen von HENAFF und Mitarbeitern (1957, 1960).

Auf allen diesen Gebieten ist im letzten Jahrzehnt eine intensive Tätigkeit in Gang gekommen, so daß ein immer breiteres und durchaus ermutigendes klinisches Erfahrungsmaterial vorliegt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß eine systematische Auswertung dieses großen Erfahrungsgutes, welches bisher ohne wechselseitige Beziehung neben der Zellulartherapie besteht, für beide Arbeitsrichtungen interessante Erkenntnisse erbringen kann.

E. Über die Erhaltung der therapeutischen Wirkung

Im Rahmen dieser Monographie ist es im Grunde weniger wichtig, welche der zahlreichen verschiedenen Eigenschaften von Gewebe nach der Gefriertrocknung noch erhalten sind und welche nicht, sofern nur das maßgebliche und allein entscheidende Kriterium, die therapeutische Wirkung, der des Frischgewebes vergleichbar ist. Diese Frage hier beantworten zu wollen, würde die folgenden Artikel dieses Buches vorwegnehmen, da die überwiegende Zahl der

Untersuchungen über die Zellulartherapie mit gefriergetrocknetem Gewebe durchgeführt wurden, und das Suchen nach dem «ob» und «wie» einer pharmazeutischen Wirkung der Ariadnefaden dieses Werkes ist.

Es ist klar, daß die vorn beschriebene Erhaltung zahlreicher einzelner, definierter Eigenschaften des Gewebes nichts für die Zellulartherapie als solche beweist, sondern höchstens verständlich macht, warum auch eine gefriergetrocknete Gewebekonserve zu solchen Leistungen noch befähigt sein kann.

Umgekehrt vermag die Aufreihung des Wissens über die Gefriertrocknung ein Bild zu geben, welche Eigenschaften des Gewebes jedenfalls für eine zellulartherapeutische Wirkung nicht in Frage kommen, weil sie durch die Gefriertrocknung zerstört werden. Dies sind die Eigenschaften des «Überlebens» und, wenigstens bis zu einem gewissen Grade, die Erhaltung der feineren mikroskopischen und submikroskopischen Gewebestruktur.

Dagegen läßt sich zeigen, daß die für die therapeutische Wirkung am häufigsten in Anspruch genommenen Bestandteile des Gewebes – das organspezifische Eiweiß und die für die Eiweißbildung und Zellproduktion verantwortlichen Nucleoproteide – in der Tat nach der Gefriertrocknung unzerstört erhalten sind.

Pharmakologische Grunduntersuchungen zur Zellulartherapie

VON PRIVATDOZENT DR. KARLHEINZ NEUMANN, KÖLN

A. Einführung

Über die Pharmakologie der Zellulartherapie zu referieren, ist ebenso reizvoll wie schwierig. Schwierig, weil das Untersuchungsmaterial sehr verstreut ist und kritischer Sichtung bedarf. Reizvoll, weil es gewissermaßen an den Nerv der Sache rührt, das Vorhandene vom Standpunkt der Pharmakologie als der von Hause aus für die Erforschung und Beurteilung von Arzneimitteln zuständigen Wissenschaft zu betrachten.

Tatsächlich ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine Pharmakologie der Zellulartherapie mehr Programm als Ereignis. Ohne Zweifel besteht eine Diskrepanz zwischen der weiten Verbreitung dieser Therapie und der geringen Beteiligung der pharmakologischen Forschung, und man fragt nach einer Erklärung dafür. Die oberflächlichste Antwort, die man erhalten kann, ist, daß die Zellulartherapie als sogenannte «magische Therapie» außerhalb der Zuständigkeit naturwissenschaftlicher Fachdisziplinen stehe. Diese Auffassung kann zu ihren Gunsten einige negative Experimente sowie ein Maximum an Bequemlichkeit geltend machen. Auch widerspricht es der Logik, das erst zu Beweisende zur Voraussetzung von Schlußfolgerungen zu machen. Als zweiten Grund hört man die für ein wissenschaftliches Heilverfahren ungewöhnliche Art der Einführung in Deutschland «ex auditorio» statt «ex cathedra». Ohne Zweifel hat die Zellulartherapie nach einem glänzenden Start die Aufgabe, Tiefgang zu gewinnen, noch zu einem guten Teil vor sich.

Der Autor dieses Artikels ist jedoch der Ansicht, daß noch eine dritte Betrachtungsweise herausgestellt werden sollte: die Tatsache nämlich, daß eine Prüfung und Bearbeitung der Zellulartherapie mit dem üblichen Rüstzeug der Pharmakologie in der Tat auf Schwierigkeiten stößt. Sie rühren daher, daß die Wirkung der Zellulartherapie als indirekt ausgelöste Beeinflussung an sich physiologischer Reaktionen anderen Gesetzen folgt als die meist nach der aktuellen Konzentration des Pharmakons zu bemessende «übliche»

Reaktion auf Arneimittel. Der Autor meint, daß die Unmöglichkeit, z. B. ein Dosis-Wirkungsdiagramm aufzustellen oder die üblichen Kriterien pharmakodynamischer Wirkungen feststellen und messen zu können, sehr oft die echte Ursache für die scheinbare Teilnahmslosigkeit der pharmakologischen Forschung ist. Mit anderen Worten, daß die bisherige Unergiebigkeit pharmakologischer Untersuchungen (sensu stricto) vorwiegend aus dem Fehlen von Kenntnissen über die im Spiel befindlichen Faktoren und damit aus dem Nichtansprechen der normalen und dem Fehlen spezieller Untersuchungsmethoden stammt.

Dieser Zustand könnte mit frühen Phasen der Erforschung der Infektionskrankheiten verglichen werden, die auf dem Boden der Miasmenlehre jahrzehntelang unfruchtbar blieb, bis Koch mit der Hypothese der Bakterienübertragung und den darauf fußenden Untersuchungsmethoden den Schlüssel zu Verständnis, wissenschaftlicher Klärung und zur rationellen Therapie der Infektionskrankheiten gab.

Damit stellt sich der pharmakologischen Forschung eine Aufgabe, die nicht gering zu achten ist.

B. Versuch einer pharmakologischen Einordnung der Zellulartherapie

Arbeitshypothesen gehören zu den legitimen Mitteln wissenschaftlicher Tätigkeit, vorausgesetzt, daß sie als Hypothese deklariert und als solche behandelt werden. So sei es erlaubt, dieses Referat mit einigen Gedanken ausdrücklich hypothetischer Natur zu beginnen.

Es ist kein Geheimnis, daß die Zellulartherapie in die Erfahrungswelt der wissenschaftlichen Medizin nicht ohne weiteres einzufügen ist. Sie gehorcht nicht den Gesetzmäßigkeiten von Dosis, Wirkungsintensität und Wirkungsdauer, mit welchen die Pharmakologie normalerweise rechnet. Der Versuch, die Zellulartherapie als Hormontherapie zu klassifizieren und mit deren Methoden zu bearbeiten, ist ebenfalls erfolglos verlaufen. Die Zuordnung zur Kategorie der Reizkörpertherapien wird, wie zahlreiche gut gesicherte Erfahrungen zeigen, dem Tatsachenmaterial nicht gerecht.

Da offenbar keines der eben genannten, geläufigen Denkschemata der theoretischen Medizin auf die Zellulartherapie «paßt», bleiben zur gedanklichen Verarbeitung zwei Möglichkeiten. Die erste ist, sie der großen Gruppe der «magischen Therapien» zu-

zuordnen. Für das ärztliche Handeln würde dieser Entschluß nicht unbedingt Konsequenzen haben. Es mag auf sich beruhen, ob der «magische» Teil der ärztlichen Kunst schon heute ganz zu entbehren ist.

Dagegen hätte diese Klassifizierung der Zellulartherapie mit Sicherheit wohl zur Folge, sie aus dem Interessenkreis der wissenschaftlichen medizinischen Forschung zu eliminieren. Es erscheint jedoch mehr als fraglich, ob zu einer solchen «Verbannung» genügend Argumente vorhanden sind. Den Autor dünkt die Last der Verantwortung, aus negativen Versuchen ein generell negatives Urteil herzuleiten, ganz unvergleichbar groß.

Die zweite Möglichkeit, mit dem «Nichtpassen» der geläufigen pharmakologischen Denkschemata auf die Erfahrungen mit der Zellulartherapie ins reine zu kommen, ist, die Insuffizienz nicht bei der Therapie, sondern bei den bisher angewandten Denkschemata selbst zu suchen. Es gibt Beispiele in der Naturwissenschaft, wo solche Versuche unerwartet gute Früchte trugen.

Akzeptiert man, daß für die Beschreibung und damit auch für die sinnvolle experimentelle Fragestellung Denknormen nötig sind, die von der «klassischen» pharmakologischen Betrachtungsweise abweichen, und fragt man, was die wissenschaftliche Bearbeitung der Zellulartherapie dazu anbieten kann, so findet man in mehreren Publikationen wertvolle Unterlagen. Bei geeigneter Formulierung scheint es zu gelingen, hieraus eine allgemeine Definition der Zellulartherapie herzuleiten, die zu den gesicherten Grundlagen der wissenschaftlichen Medizin eine Brücke schlägt.

Wenn dem so ist, das heißt, wenn wirklich eine universelle Grundhypothese der Zellulartherapie aufgestellt werden kann, warum ist das nicht schon längst versucht worden? Der Verfasser meint, daß die Formulierung klarer Definitionen bisher vielleicht nicht bewußt als kardinale Aufgabe empfunden worden ist. Ob die dem Kliniker naheliegende kasuistische Betrachtungsweise, ob das zuweilen nicht adäquate Rüstzeug, die Schwierigkeit, in den Kategorien der wissenschaftlichen Medizin zu denken, oder ob das Gewicht traditioneller Ansichten einer klaren Artikulierung entgegenstanden, ist müßig zu diskutieren. Nach dieser Vorrede zur Sache selbst:

Es wird zur Diskussion gestellt, den Wirkungsmechanismus der Injektion von zerkleinertem Gewebe, das heißt, die Wirkungsweise der Zellulartherapie

darin zu sehen, daß durch die parenterale Applikation von undenaturiertem, organspezifischem Eiweiß im Empfängerorganismus gedämpfte organspezifische Antikörperreaktionen herbeigeführt werden, die nach der hierfür erforderlichen Zeitspanne in den betreffenden Organen in ähnlicher Weise zu einer veränderten und therapeutisch günstigen Reaktionslage führen, wie dies von einer aktiven Schutzimpfung gegen exogene Faktoren (Infektion) seit langem bekannt ist.

In kürzerer und damit gröberer Formulierung heißt dies, die Zellulartherapie als eine Art von «aktiver Impfung mit organspezifischen Antigenen» aufzufassen und Experiment und Erfolg mit diesem Maßstab zu messen.

Tatsächlich sind solche Gedanken nicht gänzlich neu, vielleicht nicht einmal ihre akzentuierte Formulierung. Die folgenden Artikel dieses Buches zeigen, wo ihre Grundlagen sind und wer diese schuf. Ob diese Auffassung zu halten ist, mag die Zukunft lehren.

Wichtiger erscheint dem Autor jedoch, in einem etwas stagnierenden Arbeitsgebiet Widerspruch wachzurufen und über Thesis und Antithesis einem neuen und besseren Verstehen ans Licht zu helfen.

C. Das Pharmakon

Das Pharmakon im Sinne dieser Darstellung ist zerkleinertes, meist fetales Gewebe, welches intramuskulär injiziert wird. Gewöhnlich handelt es sich um gefriergetrocknete Gewebekonserven, welche in Ringerlösung suspendiert werden. Intraperitoneale Injektion ist selten. Intravenöse Injektion ist nur versuchsweise bei Tieren mit stark zerkleinerten Präparaten durchgeführt worden.

1. Dosierung

Bei der Injektion von Frischgewebe soll die durchschnittliche Dosis beim Menschen zwischen 1 bis 4 g Gewebe liegen. Dies entspricht etwa 15 bis 55 mg/kg Körpergewicht oder 2 bis 10 mg/kg Trockengewebe. Der Inhalt einer Ampulle «Siccacell» mit 150 mg Trockengewebe entspricht somit beim Menschen einer Dosis von 2 bis 2,5 mg/kg.

Bei den tierexperimentellen Untersuchungen sind fast von allen Untersuchern höhere Dosierungen angewandt worden. So injizierte Grüber insgesamt 30 mg Trockensubstanz pro Ratte mit etwas über 100 g Körpergewicht. Dies entspricht etwa 300 mg Trockengewebe pro Kilogramm KG.

2. *Pharmakodynamische Inhaltsstoffe*

Gefriergetrocknetes Gewebe enthält praktisch unverändert alle Bestandteile, welche in frischem Gewebe vorhanden sind. Über den Chemismus von Gewebe berichten die Handbücher der physiologischen Chemie. Hier sollen – weit davon entfernt, das Thema erschöpfen zu können – spezielle Untersuchungen und Befunde mitgeteilt werden.

a) Proteine

Das Gewebe wird parenteral inkorporiert. Ein Teil des Eiweißes ist im Gewebe festgelegt, ein Teil wird bei der Suspension aus dem Gewebe herausgelöst und in flüssiger Form injiziert.

α) *Gesamtprotein*

Die Trockensubstanz von Siccacell-Niere enthält nach GRÜBER (1955) 47,9 % Eiweiß bei einem Stickstoffgehalt von 7,6 %. Bei einem Proteingehalt von 30 bis 50 % werden mit einer Ampulle somit etwa 45 bis 75 mg Eiweiß injiziert.

Zum Vergleich hat H. SCHMIDT (1958) angeführt, daß sich zum Beispiel in Tetanus-Serum der Behring-Werke mit 3000 Antitoxin-Einheiten je nach der Art des Serums zwischen 200 und 1000 mg Eiweiß befinden. Bei der Serumtherapie wird somit oft um ein Vielfaches mehr Protein appliziert als bei der Zellulartherapie.

β) *Lösliches Protein*

Nach H. SCHMIDT (1958) geben die in iosotonischer Lösung suspendierten gefriergetrockneten Gewebepartikel innerhalb kurzer Zeit stickstoffhaltige Stoffe in die Lösung ab, «so daß man sicher sagen kann, daß auch bei der Injektion von Sicca-Zellen antigenes Material in gelöster Form mitinjiziert wird».

Von H. SCHMIDT ist geschätzt worden, daß der lösliche Anteil des Eiweißes durchschnittlich 3,1 % des Trockengewichtes ausmacht. Dies wären ca. 4,7 mg Eiweiß bei Injektion des Inhaltes einer Siccacell-Ampulle mit 150 mg Einwaage.

ROTHER (zit. nach H. SCHMIDT, 1958) soll im Überstand der nach Vorschrift suspendierten und dann zentrifugierten Suspension von Sicca-Zellen der Niere bei einem Gewebeinhalt von ca. 100 mg Trockengewicht 13 mg Eiweiß oder N-haltige Bestandteile gefun-

den haben. Das sind 6 bis 7 % des Gewebetrockengewichtes. Von DAHMEN sind etwas niedrigere Zahlen gefunden worden:

Tabelle 3

Organ	mg N/ml in Extrakt mit Ringerlösung bei 37°C	
	nach 2 Minuten	nach 60 Minuten
Siccacell-Leber	0,64/100 mg Einwaage	0,84/100 mg Einwaage
Siccacell-Placenta	0,62/100 mg Einwaage	0,68/100 mg Einwaage
Siccacell-Herz	0,62/100 mg Einwaage	0,66/100 mg Einwaage

Jedenfalls zeigen diese Untersuchungen, daß etwa 3 bis 8 % des Trockengewichtes (oder etwa 6 bis 20 % des Gesamtproteins) bei der Suspension aus dem Gewebe herausgelöst und mit der Suspensionsflüssigkeit injiziert werden. Interessant ist dabei die Feststellung, daß die Menge der herausgelösten stickstoffhaltigen Substanzen von der Dauer der Extraktion praktisch unabhängig ist.

Es ist klar, daß es sich bei den aus dem Gewebe herausgelösten stickstoffhaltigen Substanzen nicht ausschließlich um Eiweiß handeln muß. Es werden Aminosäuren dabei sein und in einem kleinen Prozentsatz wohl auch andere stickstoffhaltige Substanzen wie Kreatin, Kreatinin, Glukosamin usw.

b) Aminosäuren

Qualitative oder quantitative Angaben über die mit dem Gewebe zugeführten Aminosäuren sind aus den einschlägigen Handbüchern zu entnehmen.

Interessant sind die Überlegungen von GRÜBER (1955), die allerdings wohl nur für einen Spezialfall zutreffen dürften. GRÜBER hatte nach Injektion recht hoher Dosierungen (ca. 300 mg/kg) von Siccacell-Niere gute Erfolge bei Therapieversuchen an experimenteller Salvarsannephritis beobachtet. Zur Erklärung des therapeutischen Erfolges führt GRÜBER an, daß in den von ihm injizierten Nierenzellen bei 1 bis 2 % schwefelhaltigen Aminosäuren im Eiweiß die verabfolgte Menge sulfhydrilhaltiger Aminosäure für die Entgiftung des Neo-Salvarsan ausreichend sei.

Die Annahme einer Entgiftung durch Sulfhydrilgruppen tragende Aminosäuren ist bei der Höhe der von GRÜBER applizierten Gewebemenge nicht von der Hand zu weisen. Eine solche Entgiftung von Schwermetallen durch sulfhydrilhaltige Verbindungen ist wiederholt beschrieben worden (vergleiche auch NEUMANN und HARBERS 1953). Ebenso wurde ein sulfhydrilgruppenabhängiger Entgiftungseffekt für die therapeutische Wirkung von Eiweißhydrolysaten schlechthin verantwortlich gemacht (zum Beispiel WACHTER und STILLE 1953).

Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß es sich hierbei um einen der Zellulartherapie fremden zusätzlichen Effekt handelt, der nur als Folge der hohen Dosierung bei den Versuchen von GRÜBER überhaupt zur Diskussion kommen kann. Andere Hinweise darauf, daß die Aminosäuren in einer stöchiometrisch aufzufassenden Weise an der Wirkung der Gewebeinjektion beteiligt sind, wurden nicht gefunden.

c) Hormone

Es liegt nahe, bei der Injektion inkretorischen Gewebes den therapeutischen Effekt in der Wirkung der in dem Gewebe enthaltenen Hormone zu suchen. Bestünde diese Annahme zu Recht, so wäre die Zellulartherapie als Hormontherapie zu verstehen. Ihrer Bedeutung entsprechend ist diese Frage wiederholt untersucht worden.

KUHN und KNÜCHEL stellten fest, daß die mit etwa 100 bis 150 mg Trockengewebe der Nebenniere übertragene Menge an 17-Ketosteroiden 5 bis 8 mg betrug. Die im Anschluß an die Injektion festgestellte, mehrere Wochen lang anhaltende tägliche Mehrausscheidung lag jedoch zwischen 8 und 9 mg. Sie folgerten mit Recht, daß somit die zugeführte Hormonmenge bei weitem nicht ausreicht, um die beobachtete Mehrausscheidung zu decken. Es handelt sich demnach nicht um eine Substitution, sondern um die Ingangsetzung eines im einzelnen unbekannten Verstärkermechanismus.

Auch die Untersuchungen von NEUMANN (1954), von BERNHARD und KRAMPITZ (1957), von STURM (1955), von KUHN und KNÜCHEL (1954), KNÜCHEL (1955) sowie weiterer Autoren stehen in direktem Widerspruch zu der Annahme, daß die im Gewebe vorgebildeten und mit dem Gewebe übertragenen Hormone die Wirkung der Zellulartherapie erklären könnten.

D. Toxikologie

Systematische Untersuchungen über eine eventuelle Schädigung des Empfängerorganismus durch das injizierte Gewebe sind spärlich. Mit ausdrücklicher toxikologischer Zielsetzung ist bisher nur von NEUMANN (1961) gearbeitet worden.

1. Pyrogene

Über die Untersuchung auf Anwesenheit pyrogener Substanzen in Trockenzellen hat NEUMANN (1961) berichtet. Die Prüfung erfolgte bei Kaninchen durch Temperaturmessung vor und nach Injektion nach den Richtlinien des DAB 6. Pro Kaninchen wurde der Inhalt einer Ampulle (150 bzw. 120 mg Trockensubstanz, entsprechend ca. 1 g Frischgewebe) injiziert. Die Injektion erfolgte bei einem Teil der Tiere intramuskulär. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Gewebe nach Homogenisierung auch intravenös appliziert. Für jede Gewebeart wurden 6 Versuchstiere verwendet. Die Prüfung umfaßte Siccacell-Leber, Siccacell-Herz und Placenta.

Versuchsresultate: Ein regelmäßiger und reproduzierbarer Temperaturanstieg wurde nicht beobachtet. Temperaturerhöhungen und Temperatursenkungen bis zu 0,3°C hielten sich etwa die Waage. Ein Hinweis auf Anwesenheit pyrogener Stoffe in dem Injektionsmaterial wurde nicht gefunden.

2. Akute Toxizität (Dosis letalis acuta)

Wie schon erwähnt, sind bei Tierversuchen stark überhöhte Dosierungen appliziert worden, ohne daß über letale Folgen berichtet wurde. Zum Beispiel hat GRÜBER (1954) bei seinen Versuchen an Ratten bis zu 300 mg Trockengewebe (ca. 1,5 g/kg nach Durchfeuchtung) verabfolgt. Auch v. SCHUBERT hat im Rahmen einer anderen Fragestellung Ratten das 350fache, bzw. 1750fache der auf den Menschen umgerechneten Dosis von Siccacell Placenta, weibl. Fet., verabfolgt und keine letale Wirkung mitgeteilt.

Versuche zur Bestimmung der DL_{50} oder – wenn sich eine solche nicht bestimmen ließ – der DL_5, stammen von NEUMANN (1961). Als Versuchstiere wurden Mäuse verwendet (Stamm BLH). Die Injektion erfolgte in die Muskulatur des Oberschenkels. Zur Applikation möglichst großer Gewebemengen wurde der Ampulleninhalt

mit einem Minimum an Suspensionslösung aufgeschwemmt. Bei der Applikation sehr hoher Dosierungen wurde in beide Oberschenkel injiziert. Die maximal injizierbare Gewebemenge betrug 4 bis 5 g/kg. Auf das Körpergewicht des Menschen umgerechnet, entspricht dies etwa dem 250fachen der therapeutischen Dosis. Größere Gewebemengen konnten aus Gründen des Injektionsvolumens nicht appliziert werden. Die Versuchsergebnisse mit dieser Dosis sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 4

Versuch der Bestimmung einer Dosis letalis acuta bei Mäusen

Gewebeart («Siccacell»)	höchste injizierte Dosis	Tierzahl bei dieser Dosierung	tot %	DL_5	therapeut. Index
fetale Leber	4,8 g/kg	25	0	>4,8 g/kg	>240
fetales Herz	4,8 g/kg	25	0	>4,8 g/kg	>240
Placenta	3,8 g/kg	25	0	>3,8 g/kg	>190

Die Untersuchungen zeigten, daß die maximal injizierbare Dosis von 4 bis 5 g/kg Gewebe von allen Tieren ohne akute Todesfolge vertragen wurde. Eine regelrechte DL_{50} zu bestimmen, war somit unmöglich.

Im Hinblick auf die normale therapeutische Dosierung beim Menschen errechnet sich nach diesen Versuchen ein therapeutischer Index von mindestens 200 bis 250. Gewöhnlich ist man bei Injektionspräparaten zufrieden, wenn der therapeutische Index 100 nicht unterschreitet. Vom Standpunkt der akuten Toxizität aus ist somit ein Bedenken gegen die Injektion der drei geprüften Gewebearten nicht zu begründen.

3. Subakute Toxizität

Fast alle Tierversuche über die Zellulartherapie erfordern längere Zeiträume, so daß schädliche Spätfolgen nach Injektion überhöhter Dosierungen sicher schon einmal beschrieben worden wären. Über spezielle Untersuchungen zur Feststellung einer subakuten Toxizität hat Neumann (1961) berichtet.

Versuchstiere: 60 ausgewachsene Wistar-Ratten, aufgeteilt in 4 möglichst gewichtsgleiche Gruppen:
a) Kontrolltiere
b) Injektion fetale Leber
c) Injektion fetales Herz
d) Injektion Placentagewebe

Dosierung: 1 g Gewebe pro kg Körpergewicht. Das entspricht etwa der 50fachen therapeutischen Dosis. Applikation von 6 Injektionen in 10 Tagen. Unmittelbar danach Tötung und Sektion eines Teiles der Tiere. Beobachtung des Restes während zweier Monate.

Ergebnisse der Untersuchungen

Absterberate: Von den Versuchstieren starb nur ein einziges Tier. Charakteristische Symptome oder pathologisch-anatomische Veränderungen wurden nicht beobachtet.

Gewichtsveränderungen: In den drei Wochen nach der ersten Injektion wurden folgende Abweichungen des Körpergewichtes der Versuchstiere von dem der Kontrolltiere festgestellt:

Tabelle 5

Subakute Toxizität bei Ratten. Veränderungen des Körpergewichtes der Versuchstiere zwischen Vorbereitungszeit (Mittelwert aus 45 Wägungen je Gruppe) und den Wägungen am 5. und 40. Tag nach der letzten Injektion (Mittelwert aus 30 Wägungen je Gruppe).

Injiziertes Gewebe (1000 mg/kg)	Veränderungen des Körpergewichtes
Kontrolltiere	0 %
fetale Leber	— 1,8 %
fetales Herz	— 2,0 %
Placenta	+ 0,5 %

Die Tabelle zeigt nach Applikation der 50fachen therapeutischen Dosis bei einer Versuchsgruppe eine schwache Zunahme und bei zwei Versuchsgruppen eine geringfügige Abnahme des Körpergewichtes. Verglichen mit den Gewichtsabnahmen, die man bei anderen Injektionspräparaten nach 50facher Überdosierung sehen kann, ist die Belastung der Versuchstiere hier ungewöhnlich klein.

Sektion: 10 Tage nach der letzten Injektion wurden von jeder

Gruppe sechs Tiere getötet und seziert. Makroskopisch wurden keine auffälligen Befunde erhoben. Die Gegenüberstellung der Durchschnittsgewichte der wichtigsten Organe, ausgedrückt in Prozent des Körpergewichtes der sezierten Tiere, lautet wie folgt:

Tabelle 6

Mittelwerte der Organgewichte 10 Tage nach der letzten Injektion (subakute Toxizität, Ratten)

Injiz. Gewebe (1,0 g/kg)	Organgewicht (% des Körpergewichtes)			
	Leber	Milz	Nieren	Nebennieren
Kontrolltiere	3,97	0,45	0,62	0,016
fetale Leber	4,10	0,27	0,67	0,014
fetales Herz	3,89	0,47	0,62	0,018
Placenta	3,89	0,40	0,68	0,017

Hinweise auf pathologische Organveränderungen gibt die Wägung nicht. Es ist jedoch interessant, daß nach Injektion von fetaler Leber das Gewicht der Lebern der Empfängertiere etwas über dem Durchschnitt lag (organspezifische Wirkung?).

Mikroskopische Untersuchung der Organe ergab keine Hinweise auf pathologische Veränderungen. Leukocytenzahl und Erythrocytenzahl sowie die Auszählung von Differentialblutbildern zeigten keine Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren.

Die Versuchsresultate besagen, daß Anzeichen für eine subakute Toxizität nach mehrfach wiederholter Injektion nicht festzustellen sind.

4. Subchronische und chronische Toxizität

Chronische Toxizität verursacht Schädigungen, die erst nach langdauernder Verabfolgung eines Präparates auftreten. Gewöhnlich werden ½- bis zweijährige Versuchszeiträume gewählt. Da eine jahrelange Dauermedikation, wie sie mit Tabletten häufig durchgeführt wird, bei der Zellulartherapie fortfällt, genügt hier eine Untersuchung auf subchronische Toxizität, wobei jedoch der zum Auftreten allergischer Reaktionen nötige Zeitraum eingeschlossen werden muß. Diese Beachtung allergischer Erscheinungen ist um so wichtiger, als JELLINGER und SEITELBERGER (1958) über eine tödlich verlaufene Entmarkungs-Encephalitis beim Menschen berichtet ha-

ben, die sie mit vorausgegangenen wiederholten Injektionen von Gewebe in Zusammenhang bringen.

Untersuchungen über die subchronische Toxizität von Gewebeinjektionen hat NEUMANN (1961) durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden Hunde verwendet. Jede Versuchsgruppe bestand aus drei Tieren. Das Alter der Hunde betrug nach Abschluß der Vorbereitungszeit, das heißt zu Beginn der ersten Gewebeinjektion, etwa 5 Monate.

Während der Vorbereitungszeit der Tiere wurden die üblichen Quarantänemaßnahmen durchgeführt, unter anderem Impfung, Wurmkur, regelmäßige Wägung zur Feststellung gleichmäßiger Gewichtszunahme. Vor Applikation der Gewebepräparate wurden die anschließend beschriebenen Untersuchungen zweimal hintereinander durchgeführt.

An die Vorbereitungszeit schloß sich die Injektionsperiode an, in der, auf etwa vier Wochen verteilt, insgesamt sieben intramuskuläre Injektionen verabfolgt wurden. Pro Injektion und Hund wurde der Inhalt einer Ampulle injiziert. In Anbetracht des Körpergewichtes der Versuchstiere errechnet sich, daß insgesamt etwa das 50fache der beim Menschen mit einer Ampulle injizierten therapeutischen Dosis verabfolgt wurde. Während und nach der Injektionsperiode wurden an den einzelnen Tieren klinische Laboratoriumsuntersuchungen durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere getötet und seziert.

Aus Platzgründen kann das bei solchen Untersuchungen anfallende umfangreiche Untersuchungsmaterial nur zusammenfassend und gekürzt wiedergegeben werden.

Beobachtung der Tiere: Im allgemeinen Verhalten der Versuchstiere war gegenüber den Kontrolltieren kein Unterschied festzustellen. An den Injektionsstellen (die Injektion erfolgte abwechselnd in die Muskulatur des rechten und des linken Oberschenkels) wurden keine Entzündungserscheinungen oder sonstigen Reaktionen festgestellt. Kurz nach der Injektion war eine leichte Schwellung entsprechend dem injizierten Volumen vorhanden, und die Hunde liefen während der ersten Stunden etwas steifbeinig.

Gewichtsverlauf: Der Gewichtsanstieg der Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ist ein wichtiges Kriterium für eine etwaige Schädigung der Versuchstiere durch das Therapeutikum.

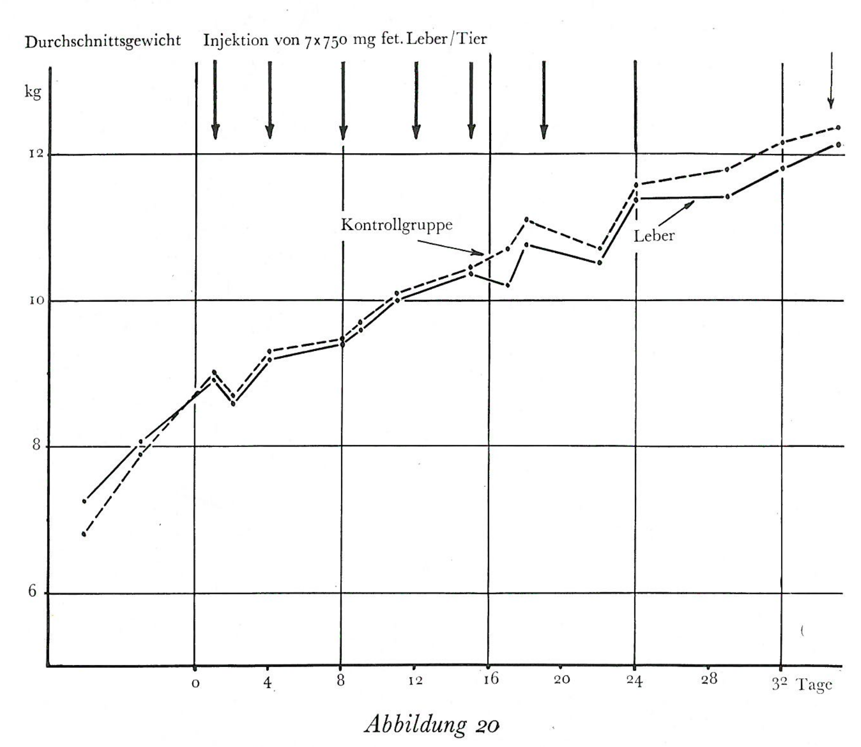


Abbildung 20

Gewichtszunahme der Versuchstiere (—) und der Kontrolltiere (---) während der Versuchsdauer. Abszisse = Tage.

Die Einzeltiere jeder Versuchsgruppe wurden zweimal wöchentlich zur gleichen Tageszeit gewogen und das Durchschnittsgewicht jeder Tiergruppe errechnet. Das Diagramm oben zeigt den Gewichtsverlauf der Kontrolltiere und der Versuchstiere während der siebenmaligen Injektion von je einer Ampulle «Siccacell fetale Leber».

Während in der ersten Versuchsperiode das Körpergewicht der Versuchstiere und der Kontrolltiere praktisch völlig übereinstimmt (die Tiere wurden in Einzelboxen unter sorgfältig standardisierten Bedingungen und gleichmäßigem, ebenfalls standardisiertem Futter gehalten), ist nach dem 15. Versuchstag ein geringfügiges Auseinanderweichen der Kurven festzustellen. Im weiteren Verlauf der Beobachtungszeit bis zur Tötung der Tiere vergrößert sich die Diskrepanz jedoch nicht. Nach Beginn der Gewebeinjektionen betrug die

Gewichtszunahme der Kontrolltiere 45 % gegenüber 42 % Gewichtszunahme bei den Versuchstieren.

Ergebnisse der klinischen Laboruntersuchungen: Vor der ersten Gewebeinjektion wurden zwei Untersuchungsreihen durchgeführt. Nach Beginn der Injektionen wurden die Hunde am 7., 14., 21., 27. und 40. Tag erneut zur Untersuchung gebracht. Da sich eine ins einzelne gehende Wiedergabe der Ergebnisse aus Platzgründen verbietet, können hier nur die Durchschnittswerte von Versuchstieren und Kontrollen verglichen werden.

Tabelle 7

Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse nach Injektion von 7mal 750 mg fetaler Leber bei Hunden

Untersuchung auf	Mittelwerte der Versuchsergebnisse (1. bis 40. Tag nach Injektionsbeginn)	
	Kontrolltiere	Versuchstiere
Gewichtszunahme (in 40 Tagen)	45 %	42 %
Körpertemperatur	38,26°C	38,31°C
Blutdruckänderung (gegenüber der Vorbereitungszeit)	—1,7 mm Hg	—1,8 mm Hg
Herzfrequenz	131	125
Atemfrequenz	44,8	41,8
Leukocytenzahl (pro mm³) . . .	10698	8550
Erythrocytenzahl (Mill./mm³) . .	4,869	5,267
Osmotische Resistenz	0,334–0,528	0,336–0,506
Koagulationszeit	45"	43"
Leberfunktionstest (Bromsulfaleinausscheidung)	92,6 %	92,4 %

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Gewichtszunahme, wie schon beschrieben, nur einen sehr geringfügigen Unterschied zugunsten der Kontrolltiere zeigt. Die Körpertemperatur der Versuchstiere ist praktisch die gleiche wie bei den Kontrolltieren. Eine Veränderung des Blutdruckes unter dem Einfluß der injizierten Präparate ist nicht festzustellen. Der etwas niedrigere Durchschnittswert für die Herzfrequenz ist nicht signifikant. Das gleiche gilt für den etwas niedrigeren Durchschnittswert für die Atemfrequenz.

Die durchschnittliche Leukocytenzahl, die bei Hunden bekanntermaßen innerhalb weiter Grenzen schwanken kann, liegt innerhalb der zufallsbedingten Streuung. Außerdem wird der höhere Wert bei den Kontrolltieren gefunden, so daß für das Vorliegen entzündlicher Prozesse oder anderer mit einer Vermehrung der Leukocytenzahl einhergehender Reaktionen bei den Versuchstieren kein Anhaltspunkt vorhanden ist. Die Erythrocytenzahl liegt bei den mit fetaler Leber behandelten Versuchstieren etwas höher als bei den Kontrolltieren. Es wäre interessant, wenn sich feststellen ließe, daß die in embryonaler Leber stattfindenden Blutbildungsprozesse nach der Injektion dieses Gewebes zu einer erhöhten Erythrocytenausschwemmung oder Erythrocytenbildung des Empfängerorganismus führen könnten. – Die osmotische Resistenz der Erythrocyten ist unverändert. Ebensowenig ist eine Beeinflussung der Koagulationszeit festzustellen. Die unveränderte Höhe der Bromsulfalein-Ausscheidung beweist eine ungestörte Leberfunktion.

5. Zusammenfassung

Auf Grund der beschriebenen Untersuchungsergebnisse ist eigentlich kein Anhaltspunkt dafür vorhanden, daß bei der normalen therapeutischen Anwendung einwandfrei hergestellter Gewebepräparate eine toxische Wirkung zu befürchten ist. Es ist einzuräumen, daß eine Ausdehnung der Untersuchungen auf weitere Organe wünschenswert ist. Auch bei wiederholter Injektion stark überhöhter Dosierungen wurden keine Schädigungen der Versuchstiere festgestellt, obwohl bei einem Teil der Versuche die Zeitspanne bis zur Ausbildung von Antikörpern weit überschritten wurde. Allerdings bedarf die Frage allergischer Reaktionen noch gesonderter Behandlung.

E. Resorption, Verteilung, Ausscheidung

1. Einführung

Fast stets nimmt die genauere wissenschaftliche Erforschung eines Pharmakons zuerst ihre Richtung auf die Klärung der Frage nach der Aufnahme in den Säftestrom, nach der Deponierung in bestimmten Organen oder Geweben und nach Weg, Zeit und Zustandsform bei der Ausscheidung aus dem Körper. Sehr oft lassen sich nach der

Klärung dieser Fragen bereits die entscheidenden Schlußfolgerungen auf Angriffspunkt und Wirkungsweise ziehen.

Bei der Zellulartherapie steht eine systematische Bearbeitung dieser Fragen noch aus. Dennoch sind einige Ansatzpunkte vorhanden.

2. Resorption und Transport

Die Frage nach dem Verbleib des injizierten Therapeutikums ist ein legitimes Anliegen pharmakologischer Untersuchungen. Merkwürdiger- und bedauerlicherweise ist dieser Komplex stets als Randgebiet behandelt worden. Die Anschauungen darüber haben im Laufe der Zeit starke Wandlungen erfahren.

NIEHANS (1954) stellte noch drei Möglichkeiten zur Diskussion:

1. Die injizierten Zellen wandern in dem neuen Wirtsorganismus zu dem Organ, von dem sie selbst stammen, wenn dieses sie benötigt.
2. Die injizierten Gewebezellen leben an der Injektionsstelle weiter und üben eine Fernwirkung auf das erkrankte Organ aus.
3. Das injizierte Gewebematerial wird an der Injektionsstelle abgebaut und vom Organismus zur Unterstützung oder Heilung des entsprechenden Organes verwendet.

Von den ersten beiden Thesen ist man frühzeitig abgekommen, da es als gegebene Tatsache anzusehen war, daß gefriergetrocknete Gewebezellen nicht überleben und andererseits mit gefriergetrocknetem Gewebe im großen ganzen die gleichen Wirkungen erzielt wurden wie mit Frischzellinjektionen. Die Lebensfähigkeit ist offenkundig keine Voraussetzung für die Wirkung der Gewebeinjektion. Dies muß man sich auch vor Augen halten, wenn man embryologische Transplantationsversuche zur Erklärung der Zellulartherapie heranzieht.

Es bleibt somit zu klären, ob das injizierte, tote Zellmaterial an der Injektionsstelle liegenbleibt oder gemäß These 3 abgebaut und abtransportiert wird.

Nach Injektion von radioaktiv markiertem Gewebe hat HARBERS (1955) die Geschwindigkeit des Abtransportes von der Injektionsstelle gemessen. Die Resorptionsrate betrug nach Injektion von Lebergewebe etwa 5 bis 7% je Tag. Die Resorptionsrate war unverändert, wenn den Empfängertieren die Milz entfernt wurde. Sie stieg auf 15 bis 20% je Tag, wenn das markierte Lebergewebe Ratten nach vorausgegangener Schädigung der Leber durch CCl_4-In-

jektionen verabfolgt wurde. Die Resorptionsgeschwindigkeit von markiertem Milzgewebe wurde durch Splenektomie nicht beschleunigt.

Die Untersuchung, welche chemische Verbindung mit P^{32} am längsten am Injektionsort verbleibt, zeigte, daß dies die Nucleinsäurefraktion ist.

Über die Art und das Vehikel des Transportes des intramuskulär injizierten Gewebes ist praktisch nichts bekannt. Den Transport nach intraperitonealer Injektion behandelt F. Schmid in diesem Buch.

3. Verteilung im Organismus

Es ist ein Lieblingsgedanke der älteren Zellulartherapie, daß das injizierte Gewebe zu dem homologen Organ hinwandere, wenn schon nicht als unversehrte Zelle, so doch in Form der Zellfragmente oder wenigstens der chemischen Bestandteile des injizierten Gewebes. Diese Vorstellung hat sich jedoch durch die bisherigen Untersuchungen nicht bestätigen lassen, was übrigens sicher auch keinen Verlust bedeutet. Untersuchungen hierüber wurden etwa gleichzeitig von Lettré und Mitarbeitern (1955) sowie von Harbers (1955) durch Applikation radioaktiv markierten Gewebes und Messung der radioaktiven Anreicherung in den Organen untersucht. Lettré konnte zeigen, daß nach Injektion von P^{32}-markiertem Herz-, Leber- und Nierengewebe von einer spezifischen Anreicherung im homologen Organ keine Rede ist. Nur nach Injektion markierten Hirngewebes war die Aktivitätszunahme im Cerebrum des Empfängertieres etwa doppelt so hoch, wie bei gleichmäßiger Verteilung zu erwarten gewesen wäre.

Verglichen mit der Injektion von markiertem Totalgewebe, erfolgte die Anreicherung von radioaktiven Verbindungen in den Zellkernen der Organe des Empfängertieres dann am raschesten, wenn markierte Mitochondrien, markierte Kernsubstanz oder markierte Nucleinsäuren injiziert wurden, und langsamer, wenn anorganisches Phosphat oder markierte Phospholipoide injiziert worden sind.

Von Harbers (1955) wurde festgestellt, daß nach Injektion von radioaktiv markiertem Lebergewebe bei Ratten die Konzentration von P^{32} in der Nucleinsäurefraktion der Leber bei gesunden Empfängertieren nur etwa halb so hoch war wie bei Tieren, bei denen

eine Tetrachlorkohlenstoff-Schädigung der Leber herbeigeführt war.

Es ist klar, daß aus der Anreicherung von Radioaktivität in einzelnen Organen des Empfängertieres nur mit großer Vorsicht auf das Schicksal der übrigen Bestandteile des injizierten Gewebes geschlossen werden kann. Ohne Zweifel wäre es höchst wünschenswert, über die Verteilung und das Verbleiben des injizierten Gewebes sehr viel mehr und Genaueres zu wissen, als die verdienstvollen Untersuchungen von HARBERS und LETTRÉ darüber sagen.

Erwähnenswert ist, daß nach diesen Studien über Resorption und Verteilung der Abtransport von der Injektionsstelle – ungleich den Verhältnissen bei flüssigen Injektionspräparaten – Tage benötigt, und daß er exponentiell erfolgt. Dieser zeitliche Verlauf des Abtransportes läßt unerklärt, warum die Wirkung der Gewebeinjektionen nicht ebenfalls exponentiell ansteigt, wie es zu erwarten wäre, wenn die Wirkung – wie es bei den meisten Pharmaka der Fall ist – konzentrationsabhängig wäre. Im Gegenteil weist dieser Widerspruch direkt darauf hin, daß andere als konzentrationsabhängige Reaktionsmechanismen vorhanden sind.

4. Ausscheidung

Über Zeitpunkt und Form der Ausscheidung des Pharmakons ist bei der Zellulartherapie so gut wie nichts bekannt. HARBERS teilte mit, daß nach Injektion radioaktiv markierten Gewebes in der Niere der Empfängertiere eine relativ hohe, gleichmäßig abnehmende Radioaktivität nachweisbar ist, was auf eine kontinuierliche Ausscheidung schließen lasse. GORDONOFF (1960) wies darauf hin, daß Injektion von Siccacell-Niere keine Diurese bewirkt.

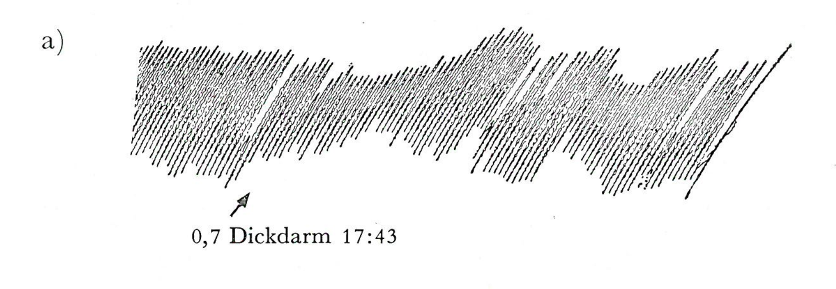
Über die Ausscheidung im Kot scheint nichts bekannt zu sein.

F. Pharmakologische Untersuchungen über die akuten Wirkungen von Geweben und Gewebeinjektionen

Bei der pharmakologischen Auswertung eines neuen Pharmakons ist seine Prüfung an isolierten Organen oder isolierten Geweben eine der ersten Maßnahmen. Sieht man von SCREENING-Methoden ab, so ist die Prüfung am isolierten Organ wohl der einfachste Weg, über Wirkung und Angriffspunkt einer neuen Substanz Vorstellungen zu gewinnen. Es mag ein Korn Wahrheit dabei sein, hierin eine

«pharmakologische Instinkthandlung» zu sehen. – Gewöhnlich schließt sich die Prüfung einzelner Funktionen des Organismus an, wie die Bestimmung der Wirkung auf Blutdruck, Herzfrequenz, Diurese usw.

Alle diese Untersuchungsgänge gehen davon aus, daß die Anwesenheit des Pharmakons eine aktuelle und mit seiner Konzentration zusammenhängende Wirkung ausübt. Da es nicht sehr wahrscheinlich ist, daß eine solche aktuelle Wirkung das Wesentliche der Zellulartherapie ist, kann aus dem Ausbleiben erwarteter Reaktionen kaum auf das Fehlen der betreffenden therapeutischen Wirkung geschlossen werden, obwohl dieser Rückschluß bei einem anderen Pharmakon seine Berechtigung haben könnte.



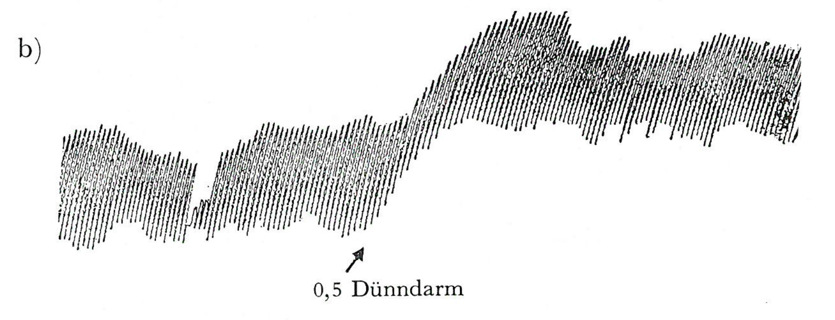


Abbildung 21 a und b

Beeinflussung der spontanen Kontraktionen am isolierten Dünndarm der Ratte unter dem Einfluß von Siccacell-Präparaten.
a) beim Pfeil 0,5 cm³ Dünndarm: Tonussteigerung
b) beim Pfeil 0,7 cm³ Dickdarm-Siccacell (Aus Gordonoff, 1960)

1. Versuche am isolierten Darm

Von GORDONOFF (1960) wurden Untersuchungen angestellt, in welcher Weise Tonus sowie Amplitude und Frequenz der spontanen Kontraktionen von isoliertem Dickdarm und Dünndarm von Ratten unter dem Einfluß von Trockenzellsuspensionen verändert werden. Leider fehlen in der Publikation Angaben über Einzelheiten der Untersuchungsmethodik, so daß einige Fragen offen bleiben. Die Versuchsresultate sollen im Wortlaut mitgeteilt werden:

«Sowohl am isolierten Dünndarm wie auch am isolierten Dickdarm der Ratte erzielt man sowohl mit Siccacell-Dünndarm wie auch mit Siccacell-Dickdarm tonussteigernde Effekte. Diese sind nicht spezifischer Natur, denn man sieht sie nach Siccacell-Dünndarm am isolierten Dickdarm und mit Siccacell-Dickdarm am isolierten Dünndarm ...»

Offenbar bestehen jedoch Unterschiede im Ausmaß der Wirkung. Jedenfalls geht dies aus den Abbildungen der Kymogramme hervor (deren Unterschriften in der Originalpublikation verwirrenderweise vertauscht worden sind).

Die Tonussteigerung unter dem Einfluß von Siccacell-Dünndarm ist eindrucksvoll, und es wäre sehr interessant, ein größeres Untersuchungsmaterial überblicken zu können. Selbst wenn das Wesentliche der Zellulartherapie mit diesen Versuchen nicht erfaßt wird, um eine bemerkenswerte Teilfunktion handelt es sich jedenfalls.

Nach GORDONOFF ist auch in vivo eine Beeinflussung der Darmtätigkeit festgestellt worden, doch liegen uns hierzu keine Einzelheiten vor.

2. Untersuchungen am isolierten Herz

In-vitro-Untersuchungen am isolierten Froschherzen stammen von GORDONOFF (1960). Die Versuche ergaben, «... daß kleine Mengen von Siccacell-Herz hubhöhensteigernd wirken, größere Konzentrationen hingegen die Herzen schädigen, so daß es zu einer Bradycardie und Arrhythmie kommt. Besonders deutlich waren die Wirkungen am asphyktischen Herzen. Schon mit 0,001 cm^3 konnten wir bei einem durch Entfernung der Sauerstoffzufuhr asphyktischen Herzen eine deutliche Verbreiterung des Kardiogrammes feststellen». Abbildung 22 zeigt ein Silhouetten-Kymogramm.

Wenn auch in der Publikation von GORDONOFF über Kontrollversuche wenig erwähnt wird, so wird man bei einem so erfahrenen

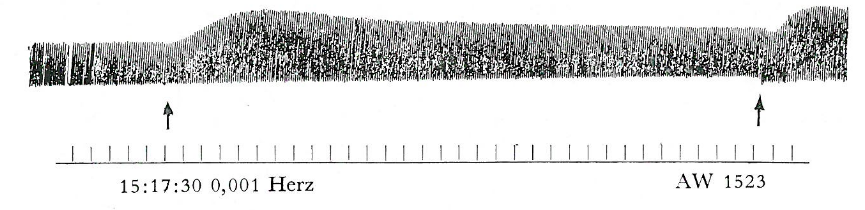


Abbildung 22

Asphyktisches, isoliertes Froschherz. Beim Pfeil links Eingabe von 0,001 cm³ Siccacell-Herz (aus Gordonoff, 1960).

Experimentator an der Beachtung aller Kautelen nicht zweifeln können. Hierfür spricht auch, daß mit Siccacell-Thalamus oder Siccacell-Nebenniere der Effekt, der mit Siccacell-Herz beobachtet wurde, nicht zu erzeugen war. Gordonoff meint, daß die Bradycardie, welche durch größere Mengen Siccacell-Herz hervorgerufen wurde, mit dem Vagus in Zusammenhang stehe. Er beschreibt, daß es gelungen ist, den Herzstillstand nach 1,0 cm³ Siccacell-Herz durch Atropin 1:100000 rückgängig zu machen.

Den Gegenpol zu diesen Untersuchungen stellen klinische Beobachtungen dar, nach denen bei Myocardschäden (unter anderen Sprado 1952) und Angina pectoris (Carstens 1957) Erfolge erzielt worden sind. Es unterliegt keinem Zweifel, daß zwischen diesen beiden Polen der Betrachtungsweise noch ein unübersehbares Feld der Bearbeitung harrt.

3. Wirkung auf Blutdruck und Kreislauf

Über die Beeinflussung des Blutdruckes sind pharmakologische Untersuchungen im engeren Sinne von Marquardt und Franz (1961) sowie von Neumann durchgeführt worden.

Marquardt führte intravenöse Injektionen mit aufgeschwemmten Siccacell-Präparaten durch. Es ist überraschend, daß die Tiere diese Prozedur überlebten. Weniger überraschend ist eine kurzdauernde, kräftige Blutdrucksenkung unmittelbar nach der Injektion. Ob es sich hierbei um die Folge der Inkorporierung blutdrucksenkender Abbauprodukte des Gewebes handelt, wie Marquardt meint, oder um die Folge von Mikroembolien der Gehirngefäße, wie Neumann vermutet, wird durch weitere Bearbeitung geklärt werden müssen. Jedenfalls weist Neumann darauf hin, daß bei fei-

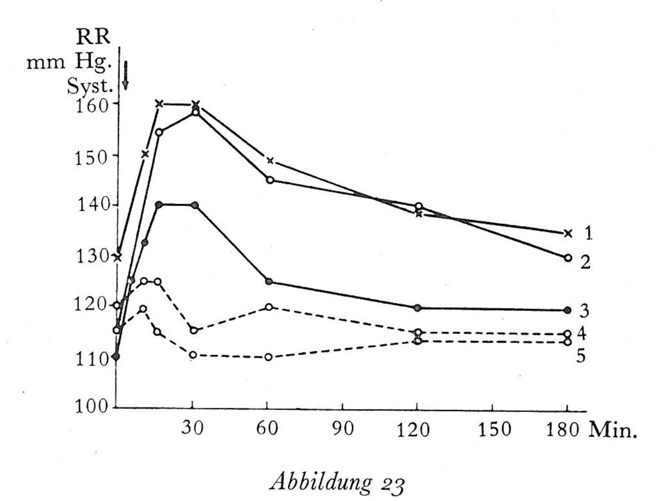


Abbildung 23

Blutdruckmessungen am Menschen. Die Kurven 1, 2 und 3 zeigen das Verhalten des systolischen Blutdrucks in den ersten Stunden nach der Injektion von Nebennieren-Trockenzellen, Kurve 4 nach Injektion von Herz-, Kurve 5 nach Injektion von Placenta-Trockenzellen. (Aus Kuhn und Knüchel 1954)

nerer Zerkleinerung der intravenös injizierten Gewebepartikel auch die Blutdrucksenkung geringer war, obwohl die Dosis unverändert gelassen wurde.

Die intravenöse Injektion ist ein Sonderfall, der bisher hauptsächlich tierexperimentell von Interesse war. Über eine akute Beeinflussung des Blutdruckes nach intramuskulärer Gewebeinjektion sind uns tierexperimentelle Arbeiten nicht bekannt geworden. An Patienten haben Kuhn und Knüchel (1954) kräftige Blutdruckanstiege nach Injektion von Nebennierengewebe mitgeteilt. Nach Injektion von Siccacell-Herz und Siccacell-Placenta war der Blutdruckanstieg unbedeutend (vgl. Abbildung 23).

Es ist kaum zu bezweifeln, daß es sich bei dem Blutdruckanstieg nach Injektion von Nebennierengewebe um eine Hormonwirkung handelt. Daß adrenalinfreies Gewebe bei intramuskulärer Injektion den Blutdruck akut verändert, ist nicht beschrieben worden.

Etwas anderes ist es mit langfristigen Wirkungen. Auf die klinische Beobachtung, daß nach Injektion von Placentagewebe eine allgemeine Blutdrucksenkung eintritt, hat Stein (1954) hingewiesen. Andererseits ist nach wiederholter Injektion von Lebergewebe in hoher Dosierung bei Hunden im Verlauf mehrwöchiger Beobach-

tung eine Änderung des Blutdruckes nicht festgestellt worden (NEUMANN 1961). Klinische Beobachtungen sind zahlreich, liegen jedoch außerhalb der pharmakologisch orientierten Betrachtung.

4. Beeinflussung der Diurese

Ob Applikation von Siccacell-Niere die Diurese akut zu erhöhen vermag, ist von GORDONOFF (1961) überprüft worden. Es wurde nach der Methode von BURN mit Ratten gearbeitet. Parallel mit den Versuchen wurden auch Kontrollen ohne Siccacell durchgeführt. Sicherheitshalber wurden auch gekreuzte Versuche angestellt.

Wie GORDONOFF mitteilt, ist es ihm in keinem Falle gelungen, einen diuretischen Effekt durch Injektion von Siccacell-Niere herbeizuführen.

Über die umfangreichen tierexperimentellen Untersuchungen zur therapeutischen Wirkung der Injektion von Siccacell-Niere bei Schädigung des Nierenparenchyms soll an anderer Stelle berichtet werden.

5. Hormonwirkungen

Wie in verschiedenen Beiträgen in diesem Buch dargelegt wird, ist die Zellulartherapie nicht als eine Hormontherapie zu verstehen, jedenfalls nicht in dem Sinne, daß das injizierte Gewebe nur als Träger von Hormonen wirkt. Es steht nicht in Widerspruch zu dieser grundsätzlichen Feststellung, daß mit einigen Organgeweben auch Hormone mit inkorporiert werden und Hormonwirkungen entfalten. Zu Beginn der wissenschaftlichen Bearbeitung der Zellulartherapie sind solche akzessorischen Hormonwirkungen zuweilen als das Wesentliche an der Zellulartherapie aufgefaßt worden.

Intensiv ist über die Hormonwirkung von Siccacell-Schilddrüse gearbeitet worden:

KUHN und KNÜCHEL (1954) haben über die Untersuchung hormoneller Wirkungen von Trockenzellen der Thyreoidea an Kaulquappen (Bufo vulgaris) berichtet.

Hierzu wurde eine Suspension von Thyreoidea-Trockenzellen in Ringerlösung hergestellt, 4 Stunden stehen gelassen, filtriert und das Filtrat dem Wasser zugesetzt, in welchem die Kaulquappen gehalten wurden. Ein Wechsel des Wassers erfolgte nach 24 Stunden. Die Beobachtung richtete sich auf die typischen Entwicklungsbeschleunigungen unter Einwirkung von Schilddrüsenhormonen.

Bereits nach 4 Tagen waren bei den so behandelten Kaulquappen die typischen Thyreoideasymptome zu beobachten. Bei wiederholter Zugabe des Extraktes aus dem Trockengewebe trat eine beträchtliche Verstärkung dieser Symptome ein. Man darf nicht vergessen, daß diese Untersuchungsmethode äußerst empfindlich ist.

Beim Menschen fanden die Autoren nach Injektion von Schilddrüsengewebe den Grundumsatz an vier Personen bei vierwöchiger Beobachtung unverändert. Ebenso sprachen Pulsfrequenz und Gewichtsverlauf nicht für eine unmittelbare Thyroxinwirkung des injizierten Gewebes. Auch von STURM (1955) konnten Wirkungen auf die Schilddrüse, die über eine Wirkung des mit dem Gewebe zugeführten Jods hinausgehen, nicht festgestellt werden.

Von GORDONOFF wurden im Asherschen Versuch an Ratten Wirkungen beobachtet, die für die Anwesenheit schilddrüsenaktiver Stoffe im Gewebe sprechen. Auch hier handelt es sich um rasch eintretende Hormonwirkungen, die für die Zellulartherapie als solche uncharakteristisch sind.

Am Beispiel des Schilddrüsengewebes ist ein Überblick über die Untersuchungen gegeben worden, wie sie ähnlich auch für die meisten anderen endokrinen Organe vorliegen und in späteren Kapiteln besprochen werden. Sie zeigen, daß mit empfindlichen Untersuchungsmethoden in den meisten Fällen geringe Hormonmengen nachweisbar sind. Sie zeigen mit guter Übereinstimmung außerdem, daß die übertragenen Hormonmengen bei weitem zu klein sind und zu rasch ausgeschieden werden, als daß sie zur Erklärung der Wirkungen der Zellulartherapie mit endokrinen Organen in Betracht kommen könnten.

6. Idiosynkrasie, Anaphylaxie

Auch anaphylaktische oder allergische Reaktionen gehören zu den rasch eintretenden Wirkungen, vorausgesetzt, daß durch Vorinjektionen bereits eine Sensibilisierung stattgefunden hat. Dennoch soll dieses wichtige Kapitel hier ausgespart bleiben, da es in mehreren speziellen Beiträgen in diesem Buch noch ausführlich behandelt wird.

G. Untersuchung langsam eintretender Wirkungen der Gewebeinjektion

Zahlreiche Beobachtungen weisen darauf hin, daß die für die Zellulartherapie typischen Wirkungen nicht akut, das heißt in Stunden

oder Tagen, sondern erst nach einer Latenzzeit eintreten, die mit 12 bis 18 Tagen angenommen wird. Im allgemeinen hat es die Pharmakologie jedoch mit akuten Wirkungen zu tun, deren Intensität zunimmt, bis die Resorption an der Injektionsstelle ihren Höhepunkt erreicht hat, und abnimmt, sobald Ausscheidungen oder Abbau den Spiegel des Pharmakons im Blut oder das Depot in den Speicherorganen absinken lassen. Beides ist eine Angelegenheit von Stunden oder äußerstenfalls von wenigen Tagen. Tatsächlich enden mit dieser Zeitspanne oder sogar schon früher auch die bisherigen Beiträge der Pharmakologie. Diese Karenz ist bedauerlich, da die Pharmakologie in der wissenschaftlichen Bearbeitung der Zellulartherapie mit Recht eine zentrale Position einnehmen sollte. GORDONOFF (1960) begründet dies wie folgt: «Da die Ansichten über die Zellulartherapie diametral entgegengesetzt sind und da vor allem die Kliniker mit Placebos die gleichen Wirkungen gesehen haben, kann nur eine pharmakologische Analyse hier die Wahrheit finden. Die Versuche mit den vierbeinigen Patienten der Pharmakologie braucht man nicht mit Placebos zu kontrollieren, vorausgesetzt, daß der Untersucher sich objektiv der Aufgabe unterzieht.» Nicht ohne Grund betont auch DE JONGH (1960) in seinem höchst kritischen Referat die außerordentlichen Erfolge der experimentellen Heilkunde. «Die gegenwärtige Medizin», so sagt er, «kann ohne Tierversuche nicht bestehen». Wer die geschichtliche Entwicklung der wissenschaftlichen Medizin vor Augen hat, kann dem nur zustimmen.

Wenn auch die Pharmakologie (sensu stricto) bisher zu Untersuchungen über die langen Zeitspannen, welche zur Erfassung der Wirksamkeit der Zellulartherapie in Betracht zu ziehen sind, wenig beigetragen hat, so bedeutet das nicht, daß derartige Untersuchungen überhaupt fehlen. Im Gegenteil ist ihre Zahl überraschend groß. Es wird auf die folgenden Beiträge verwiesen, in denen das hier Begonnene seine Fortsetzung findet.

Nachweis biochemischer Substanzen in frischentnommenen und lyophilisierten fetalen Geweben

VON PROF. DR. F. SCHMID, HEIDELBERG

Eine für die praktische Anwendung in der Therapie grundsätzliche Voraussetzung ist der Nachweis biochemischer Substanzen in den fetalen Geweben. Daß solche in lebenden oder frisch entnommenen Geweben vorhanden sind, darf als zweifelsfrei unterstellt werden. Wieviele dieser Substanzen den Konservierungsvorgang überstehen, galt es zu prüfen. Dafür bietet sich ein chemisch-analytischer Weg zur quantitativen Bestimmung an, für die speziellen Belange von Geweben schien jedoch die histochemische (cytochemische) Nachweismethode zweckentsprechender. Obwohl es sich dabei primär um qualitative Methoden – mit Farbstoffen Stoffe oder Stoffgruppen sichtbar zu machen – handelt, erlaubt doch die Intensität der Farbreaktionen grobe Aufschlüsse auch über die Quantität dieser Stoffe. Gleiche Ausgangslösungen und Technik bleiben dafür allerdings Voraussetzung. Derartige cytochemische Untersuchungen haben den großen Vorteil, den Sitz und die Verteilung der nachgewiesenen Stoffe innerhalb der Zelle erfassen zu können.

An 16 fetalen (siehe Tabelle 8) und zwei juvenilen (Hypothalamus, Nebennieren) Geweben wurden folgende Stoffe bzw. Stoffgruppen geprüft:

Substrat:	*Nachweis durch:*
Desoxyribonucleinsäure (DNS)	Feulgen, Methylgrün-Pyronin
Ribonucleinsäure (RNS)	Methylgrün-Pyronin
Nucleotide	Toluidinblau
Glykogen	Best-Karmin
	PAS nach Ptyalin
Lipoide	Sudan-Schwarz,
SH-Gruppen	n. Frederich
saure und basische Substanzen	Hämatoxylin-Eosin

Tabelle 8

Histochemische (qualitative) Analyse der wesentlichen Substanzen in verschiedenen gefriergetrockneten fetalen Geweben (Schaf, Kalb)

Organ	Hämatoxylin-Eosin		Toluidinblau (bas)	Feulgen DNS (Thymonuclein-säuren)	Methylgrün-Pyronin		Bestsches Karmin	PAS	PAS nach Ptyalin	SH-Gruppen nach Frederich	Sudan-Schwarz-Lipoide
	H (bas)	E (oxy)			MG (Nucleo-proteide Chroma-tin bas)	P (Plastin, oxy)	Glykogen (spezifisch) Bestimmung				
Blut	+	+++	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)	0	0	(+)
Bindegewebe	+	+	+	+	++	++	++	++	(+)	+	+(+)
Warthon-Sulze	+	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+(+)	++++	+
Thymus	++++	+	++++	+++	+++	(+)	+	++	+	++(+)	+
Knorpel	++	+	+	+	+	(+)	++	+	(+)	++	++
Knochenmark	++	+(+)	++	++	++	+	++	+	(+)	++	++(+)
Lymphknoten	+++	+	++(+)	++	++	+	+	+	(+)	0	++
Milz	+++	+++	++(+)	+(+)	++	+	+	+	(+)	++	+++
Leber	++	+++	++(+)	+			+++	+++	+	+++	++
Niere	++	++	++	++			++	++	+	+++	++
Placenta	+++	++(+)	+++	++	++(+)	++	++	++	+	+++	+(+)
Hypothalamus	++	++	+(+)	+(+)	+	(+)	+++	+++	+	++	++++
Großhirnrinde	++	++	++	(++)	++	+++	++	+++	++	0	+++
Großhirnmark	++	++	++	(++)	+	+	++	++	+	0	+++
Mittelhirn	++	+	+++	(++)	+	++	+	++	+	(+)	+++
Haut	++	+	++(+)	+	++	+	++	+(+)	(+)	++	++
Hoden	+++	+	++(+)	++	++	(+)+	++	+	(+)	+++	+++
Nebenniere	++	++	++	+			++	++	+	++	+++

0 = Substanz nicht nachweisbar
(+) = Substanz in Spuren
\+ = Substanz in geringen Quantitäten, in einzelnen Zellen
++ = mäßiger Gehalt in allen Zellen
+++ = Substanz reichlich in allen Zellen
++++ = außergewöhnlich hoher Gehalt

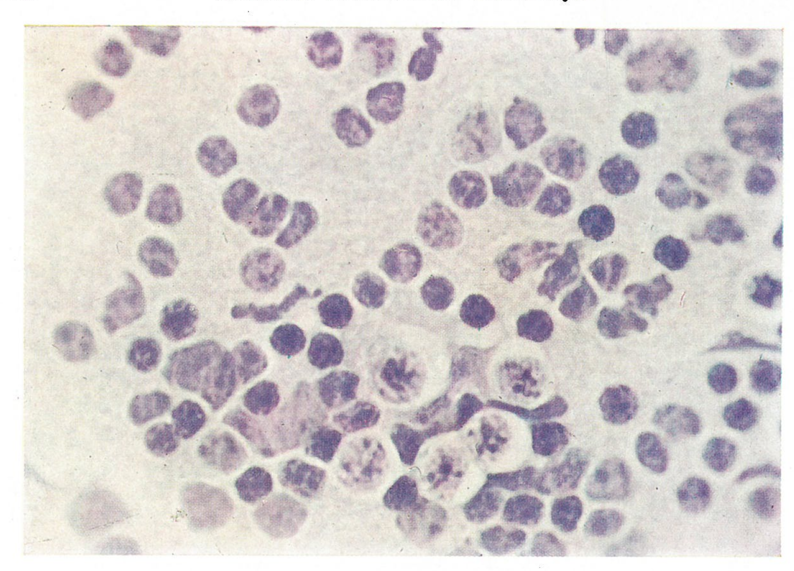


Abbildung 24 a
Nucleotidfärbung mit Toluidinblau an frisch entnommenem fetalem Thymusgewebe. Die Aktivität der Nucleotide in den Kernen ist in vielen Zellen deutlich erkennbar.

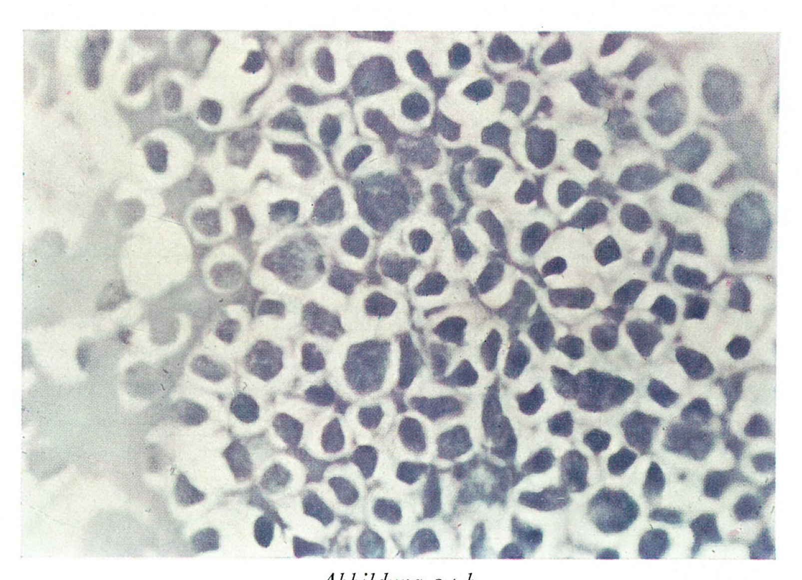


Abbildung 24 b
Nucleotidfärbung mit Toluidinblau an gefriergetrocknetem fetalem Thymusgewebe. Kerne geschrumpft, unregelmäßig, die Nucleotidkonzentration ist voll erhalten.

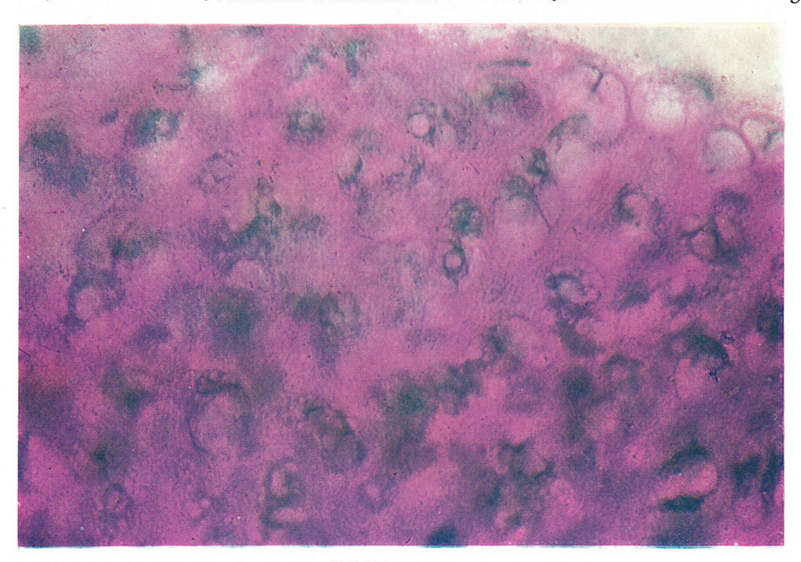


Abbildung 25
Nachweis von Desoxyribonucleinsäure (Methylgrün) und Ribonucleinsäure (Pyronin) an lyophilisiertem fetalem Knorpel. Beide Substanzen sind in reicher Menge erhalten und reaktionsfähig.

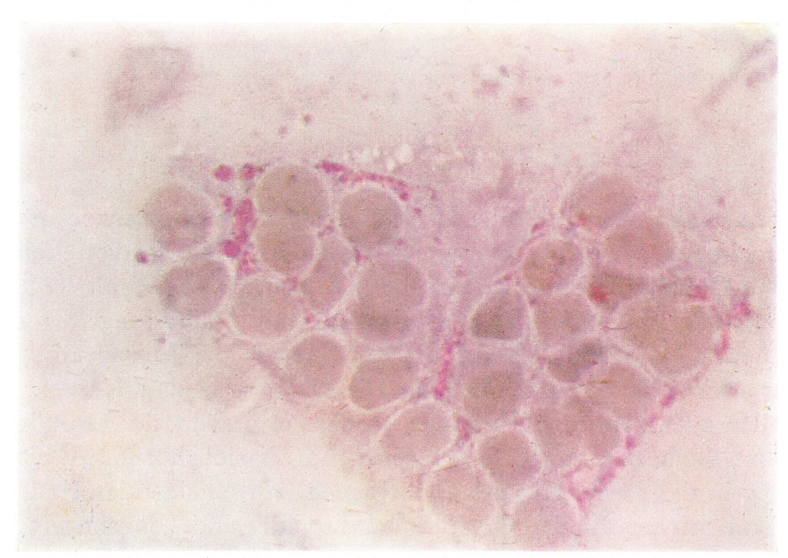


Abbildung 26
Glykogennachweis mit Bestscher Karminfärbung an lyophilisiertem fetalem Nierengewebe (Glykogen = karminrote Streifen in den Randbezirken des Cytoplasmas).

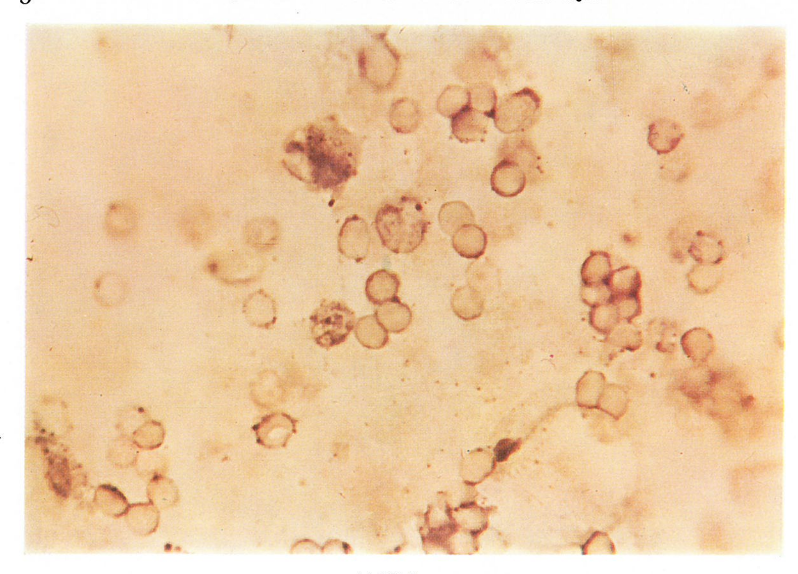


Abbildung 27
Lipoidnachweis mit Sudanschwarz. Die Lipoide finden sich vorwiegend in der Peripherie der Zellen im Bereich der Zellmembran.

Es hat sich gezeigt, daß der Gehalt an geprüften Substanzen in den einzelnen Geweben sehr unterschiedlich ist. Beispiele von hohem RNS-Gehalt (Omentum, Knorpel), hohem DNS-Gehalt (Abbildung 24, Thymus), hohem Glykogengehalt (Abbildung 26) und hohem Lipoidgehalt (Abbildung 27) mögen die Aussagefähigkeit der Methodik veranschaulichen. Die DNS ist in den Kernen der Zellen zu finden, die RNS im Cytoplasma und in der Grundsubstanz, Glykogen findet man vorwiegend als sichelförmige Ablagerung in der Peripherie des Cytoplasmas. An Nucleotiden sind die Kerne reicher als das Cytoplasma. Lipoide sind konzentriert um die Zellmembran anzutreffen, kommen aber auch im Zelleib bis um das Centrosom vor. Eine zusammenfassende Übersicht vermittelt die Tabelle 8, Seite 127.

Tabelle 9

Histochemische Analyse der wesentlichsten Substanzen in verschiedenen fetalen Geweben; frische Gewebe (15–25 Minuten nach Schlachtung)

Organ	Hämatoxylin-Eosin		Toluidinblau (bas)	Feulgen DNS (Thymonucleinsäuren)	Methylgrün-Pyronin		Bestsches Karmin	PAS	PAS nach Ptyalin	SH-Gruppen nach FREDERICH	Sudan-Schwarz-Lipoide
	H (bas)	E (oxy)			MG (Nucleoproteide Chromatin bas)	P (Plastin, oxy)	Glykogen (spezifisch) Bestimmung				
Blut	(+)	+++	+	+	(+)	+++	0	+	(+)	+(+)	++(+)
Wharton-Sulze	+	+++	+	+	+	++	+	+	(+)	(+)	++
Thymus	+++	+	++++	+++(+)	++++	(+)	+	++	+(+)	++++	+
Knorpel	++	+(+)	++	++	++	+	+	+	(+)	+	++
Knochenmark	++	+(+)	++(+)	++	+++	+(+)	+	++	+	+(+)	+++
Lymphknoten	+++	++	++(+)	++	+(+)	+	+	+	(+)	+(+)	++
Milz	+++	+++	++(+)	+++	++	+(+)	++	++	+(+)	++(+)	++
Leber	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++(+)	++	+++	+++
Niere	++	++	+++	++	++(+)	++(+)	++(+)	++	+	+++	+++
Placenta	+	+++	+(+)	++	++(+)	++	++	++	+	+++	++
Hypothalamus	++	++	++	++	++	++	++	+++	++(+)	+	++
Großhirnhemisphäre	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	++(+)	++(+)	+
Großhirnmark	++	++(+)	+++	++	+	+	++	+++	++	++	+(+)
Mittelhirn	++	++	++	++	++	++	+	++	+(+)	++(+)	+(+)
Hypophyse	++(+)	++(+)	++	++	(+)	+++	+	+(+)	+	++	(+)
Nebenniere (15 Min. nach Schlachtung)	+++	+++	++(+)	++	(+)	+++	++	+(+)	+	++	+(+)
Nebenniere (45 Min. nach Schlachtung)	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+(+)	+	++	+(+)
Omentum (fetale)	(+)	+++	+	(+)	+(+)	+++	(+)	+	(+)	(+)	++
Omentum (erw. Tier)	++	+	+	(+)	+	+(+)	(+)	+	(+)	+	++

0 = Substanz nicht nachweisbar
(+) = Substanz in Spuren
+ = Substanz in geringen Quantitäten, in einzelnen Zellen
++ = mäßiger Gehalt in allen Zellen
+++ = Substanz reichlich in allen Zellen
++++ = außergewöhnlich hoher Gehalt

Tabelle 10 (erster Teil)

Histochemische Analyse der wesentlichsten biochemischen Stoffgruppen in verschiedenen fetalen Geweben
Vergleich zwischen Frisch- und lyophilisierten Geweben

Organ	Hämatoxylin-Eosin				Toluidinblau (bas)		Feulgen DNS		Methylgrün-Pyronin			
	H		E						MG		P	
	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.
Blut	+	(+)	+++	+++	(+)	+	(+)	+	(+)	(+)	+(+)	+++
Warthon-Sulze	+	+	+++	+++	+++	+	++	+	+++	+	++	++
Thymus	++++	+++	+	+	++++	++++	+++	+++(+)	++++	++++	(+)	(+)
Knorpel	++	++	+	+(+)	++	++	++	++	++	++	+	+
Knochenmark	++	++	+(+)	+(+)	++	++(+)	++	++	++	+++	+	+(+)
Lymphknoten	+++	+++	+	++	++(+)	++(+)	++	++	++	+(+)	++	+
Milz	+++	+++	+++	+++	++	++(+)	++	+++	++	++	++	+(+)
Leber	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+++
Niere	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+++	++(+)	+++	++(+)
Placenta	+++	+	++(+)	+++	+++	+(+)	++	++	++(+)	++(+)	++	++
Hypothalamus	++	++	++	+	+	++	+	++	+	++	+(+)	++
Großhirnhemisphäre	++	++	++	+++	++	+++	+	++	++	++	++	++
Großhirnmark	++	++	++	++(+)	++	+++	+	++	+	+	+	+
Mittelhirn	++	++	+	++	++	++	+	++	++	++	++	++
Nebenniere	++	+++	++	+++	++(+)	++(+)	+	++	+++	+++	+++	++

0 = Substanz nicht nachweisbar
(+) = Substanz in Spuren
\+ = Substanz in geringen Quantitäten, in einzelnen Zellen
++ = mäßiger Gehalt in allen Zellen
+++ = Substanz reichlich in allen Zellen
++++ = außergewöhnlich hoher Gehalt

Tabelle 10 (zweiter Teil)

Histochemische Analyse der wesentlichsten biochemischen Stoffgruppen in verschiedenen fetalen Geweben
Vergleich zwischen Frisch- und lyophilisierten Geweben

Organ	Bestsches Carmin		PAS		PAS nach Ptyalin		SH-Gruppen nach FREDERICH		Sudan-Schwarz-Lipoide	
	Glykogen									
	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.	Tr.	Fr.
Blut	(+)	0	(+)	+	0	(+)	0	+(+)	(+)	++(+)
Warthon-Sulze	++	+	++	+	+(+)	(+)	++	(+)	+	++
Thymus	+	+	++	++	+	+(+)	+++	++++	+	+
Knorpel	+	+	+	+	(+)	(+)	++	+	++	++
Knochenmark	+	+	+	++	(+)	+	+	+(+)	++(+)	+++
Lymphknoten	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+(+)	++(+)	++
Milz	++	++	+	++	(+)	+(+)	++	++(+)	+++	++
Leber	+++	+++	+++	++(+)	+	++	+++	+++	+++	+++
Niere	+++	++(+)	+++	++	++	+	+++	+++	+++	+++
Placenta	++	++	++	++	+	+	+++	+++	+(+)	++
Hypothalamus	++	+++	+++	+++	+	+(+)	++	+	+++	++
Großhirnhemisphäre	++	++	+++	+++	++	++(+)	+	++(+)	+++	+
Großhirnmark	++	++	++	+++	+	++	++	++	+++	+(+)
Mittelhirn	+	+	++	++	+	+(+)	++	++(+)	+++	+(+)
Nebenniere	++	++	+++	+(+)	++	++	++	+++	+++	+(+)

0 = Substanz nicht nachweisbar
(+) = Substanz in Spuren
\+ = Substanz in geringen Quantitäten, in einzelnen Zellen
++ = mäßiger Gehalt in allen Zellen
+++ = Substanz reichlich in allen Zellen
++++ = außergewöhnlich hoher Gehalt

Ein Vergleich mit den entsprechenden Frischgeweben scheint zunächst eine höhere Stoffkonzentration bei den lyophilisierten Trokkengeweben zu ergeben. Dieser Konzentrationsanstieg ist durch die Schrumpfung der Zellen bedingt. Der Wasserentzug wird durch die Resuspension nicht voll wieder ausgeglichen, die Zellen sind morphologisch alteriert, allerdings nicht so weitgehend, daß eine histologische Gewebsdiagnostik nicht möglich wäre. Die an Thymuspräparaten mit Toluidinblau nachgewiesenen Nucleotide zeigen diese optischen Unterschiede recht deutlich auf. (Abbildungen 24 a und b.) Es sind aber, dies sei ausdrücklich hervorgehoben, in der Regel durch Volumänderungen hervorgerufene scheinbare Konzentrationsunterschiede. Lediglich bei den Lipoiden scheinen echte Unterschiede (zum Beispiel bei Gehirnsubstanz) vorzukommen.

Wesentlich an dieser cytochemischen Untersuchungsweise ist das Ergebnis, daß die wichtigsten vom Organismus aufgebauten biochemischen Stoffgruppen sowohl in den frischen als auch in den gefriergetrockneten Geweben in *reaktionsfähigem* Zustand nachweisbar sind. Damit sind die Voraussetzungen ihrer Wirksamkeit im Empfängerorganismus bei parenteraler Verabfolgung gegeben.

Eine Übersicht über die cytochemische Analyse an frischentnommenen Geweben enthält die Tabelle 9, die Ergebnisse und Unterschiede zwischen frischentnommenen und gefriergetrockneten Geweben sind vergleichend in Tabelle 10 wiedergegeben.

Aufnahme und Verteilungsprinzipien injizierter Fremdgewebe

VON PROF. DR. F. SCHMID, HEIDELBERG

Im Prinzip stehen einem Organismus drei verschiedene Wege zur Verfügung, sich mit körperfremden Geweben auseinanderzusetzen:

1. Der Einbau in die eigenen Gewebe;
2. Der Abbau mit selektiver Verwertung und selektiver Elimination;
3. Die Elimination in toto.

Das Schicksal, welches ein Gewebe in einem fremden Organismus erleidet, hängt von der phylogenetischen und ontogenetischen Verwandtschaft ab. Je weniger differenziert die Gewebe und Organismen sind, um so besser ist die gegenseitige Toleranz. Der *Einbau* gelingt deshalb bei niederen Tierarten viel leichter als beim Menschen. Im menschlichen Organismus hat man vorwiegend bei körpereigenen (Haut-Knochentransplantationen), artgleichen (Knochen, Knochenmark-, Gefäß-, Hornhauttrans- und -implantationen) gute Chancen eines echten Einbaus. Ein zumindest funktioneller Einbau liegt bei den Bluttransfusionen vor. Seltener gelingt der Einbau von artfremden Geweben. Doch auch diese Möglichkeit ist bei jugendlichen Geweben und guten Kontaktverhältnissen gegeben. Voraussetzung für das Gelingen des Einbaus ist aber immer ein enger Kontakt korrespondierender Gewebe.

Sofern ein direkter Kontakt der entsprechenden Gewebe nicht möglich ist – wie dies bei der Mehrzahl parenteral zugeführter Zell- und Gewebssuspensionen der Fall ist – werden die Aussichten auf einen direkten Einbau sehr gering. Im Regelfall dürften die anderen beiden Wege, Abbau mit selektiver Verwertung und Elimination in toto, beschritten werden. Ein klassisches Beispiel dafür bietet die Kalbshypophysenimplantation, wobei das Implantat in fremdem Gewebe (Bauchhaut) abgebaut und selektiv wirksam werden kann oder in Form eines sterilen Abszesses als Fremdkörper abgestoßen wird.

Aufgabe der nachfolgenden Versuchsanordnung war es, Aufschlüsse über die Verteilungsprinzipien von injizierten Geweben zu gewinnen. Dabei wurden artgleiche Frischgewebe und artfremde Trockengewebe untersucht.

Material und Methodik

Um die Wechselbeziehungen zwischen Spender- und Empfängergeweben verfolgen zu können, sollten

1. Einzelzellen beurteilbar sein,
2. longitudinale Studien möglich sein, ohne daß
3. der Gesamtorganismus des Empfängers in seinen physiologischen Regulationen gestört wird.

Die zunächst eingeleiteten Studien am Reizblaseninhalt konnten nicht fortgesetzt werden, da die zum Versuch gewählten Haartiere keine ausreichenden Reizblasen bilden. Als Standardobjekt wurden deshalb Bauchhöhlenexsudatzellen von weißen Ratten verwendet. Die Exsudatanreicherung wurde durch intraperitoneale Applikation von 5–10 cm^3 (in den einzelnen Reihen einheitliche Mengen) Paraffinöl erzielt. In dieses zellreiche Exsudat wurden körperfremde Zellsuspensionen – ebenfalls durch intraperitoneale Injektion – gebracht, und zwar in der

1. Versuchsserie organgleiche, artgleiche, körperfremde «Frischzellen», in der
2. Versuchsserie organfremde, artfremde Trockengewebe.

Um nun die Zellen der Empfängertiere und die Spenderzellen oder Gewebe unterscheiden zu können, wurden Vitalfärbungen mit Kongorot, Janusgrün oder Trypanblau vorgenommen; Trockengewebe, welche histologisch gut differenzierbar waren, blieben ungefärbt. Die Janusgrünfärbung mußte wegen der Mitochondrienschädigung bald verlassen werden.

Durch laufende Punktionen innerhalb von 4–6 Tagen wurde im Bauchhöhlenexsudat die Verteilung der Spender- und Empfängerzellen registriert. Die weder Spender- noch Empfängerfarbe aufweisenden Zellen wurden durch Auramin-Gegenfärbung erfaßt. Durch diese Vitalmarkierung konnte der Verteilungsquotient in den durch Punktion gewonnenen Zellen zu jedem beliebigen Zeitpunkt festgestellt werden. Ergänzend wurden bei einzelnen Tieren

Tupfpräparate aus Milz, Leber, Thymus sowie Netz-Mesenteriumpräparate angefertigt.

Die intraperitoneale Technik nimmt dabei eine Zwischenstellung zwischen der intramuskulären und intravenösen ein, kann also als Modell der beim Menschen üblichen Applikationsformen angesehen werden.

Im Versuch standen 61 Albinoratten mit einem Durchschnittsgewicht von 180 g. Die Versuche wurden mit P. Rohrbach und Flörschinger durchgeführt.

Ergebnisse

1. Artgleiche, organgleiche, körperfremde Zellen

Selbst wenn durch Ausspülen der gesamten Bauchhöhle eines Spendertieres alle Zellen übertragen wurden, also in der Bauchhöhle des Empfängertieres zunächst theoretisch gleichviel Spender- und Eigenzellen vorhanden sein müßten, zeigten die ersten Punktionen nach 10–30 Minuten viel mehr Eigen- als Spenderzellen. Das Verhältnis vital gefärbter Eigenzellen : vital gefärbten Spenderzellen lag im Durchschnitt bei 3:1 bis 6:1, aber auch Werte von 11:1 wurden registriert. Der prozentuale Anteil der Spenderzellen lag bei der ersten Punktion zwischen 1–14% aller Zellen (einschließlich der nicht gespeicherten). Aus dieser unterschiedlichen Speicherfähigkeit der Zellen ergibt sich, daß praktisch jedes Tier individuell gewertet werden muß, immerhin lassen sich folgende Gesetzmäßigkeiten ableiten:

1. Die Entfernung der Fremdzellen vom Ort der Injektion setzt sofort ein,
2. die Abnahme der Fremdzellen geht in einer exponentiell abfallenden Kurve (Abbildung 29) vor sich, und
3. vereinzelt sind auch noch nach 4–6 Tagen Zellen mit dem Fremdvitalstoff nachweisbar.

Die Abnahme der körperfremden, arteigenen, organgleichen Zellen setzt also sofort ein, geht rasch vor sich, allerdings nicht in einer konstant abfallenden Kurve.

Die vital gefärbten Eigenzellen nehmen demgegenüber wesentlich langsamer ab, bleiben viel länger im Organismus (Abbildung 28, Abbildung 33).

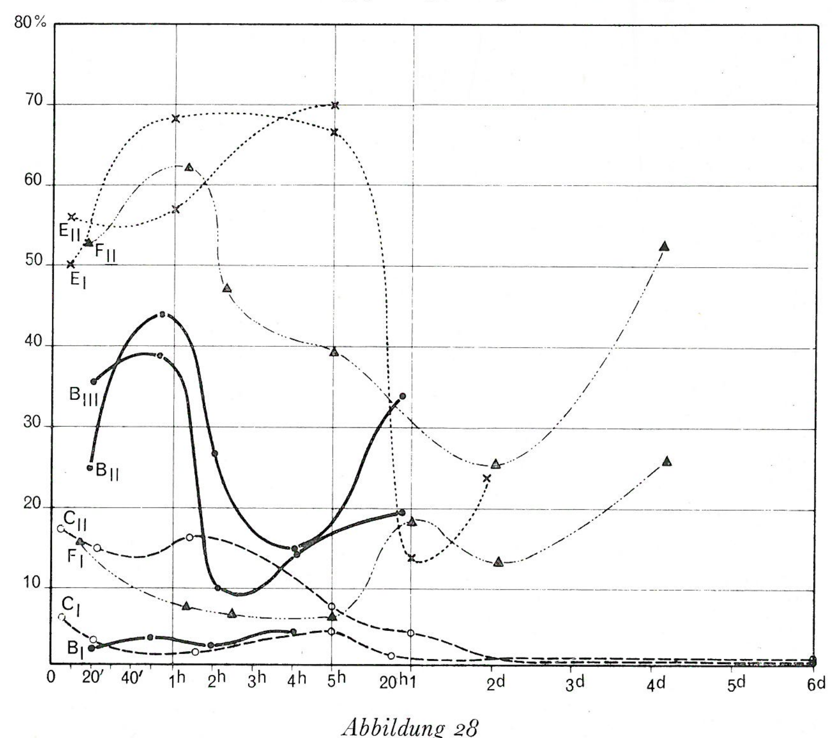


Abbildung 28
Abnahme der durch Vitalspeicherung markierten Eigenzellen im Peritonealexsudat (Meerschweinchen).

Fremdzellen verschwinden sehr rasch vom Applikationsort. Das Verschwinden kann theoretisch auf folgende Weise erfolgen:
1. Durch Auflösung,
2. durch Phagocytose,
3. durch Abtransport.

Aus den Präparaten haben wir sichere Anhaltspunkte gewinnen können für eine Phagocytose (Abbildung 36, 37) der Fremdzellen und gewisse Anhaltspunkte für eine gesteigerte Auflösung (Abbildung 37). Beide Prozesse scheinen Hand in Hand zu gehen, da vielfach Phagocytenansammlungen um Zelltrümmer und Farbstoffpartikel der Spenderzellen in den Eigenzellen beobachtet wurden. Diese «gemischtfarbigen» Zellen mit viel Eigenfarbstoff und wenig Fremdfarbstoff wurden vorwiegend in den ersten fünf Stunden in Prozentsätzen von 2–4 %, maximal 6 % gefunden.

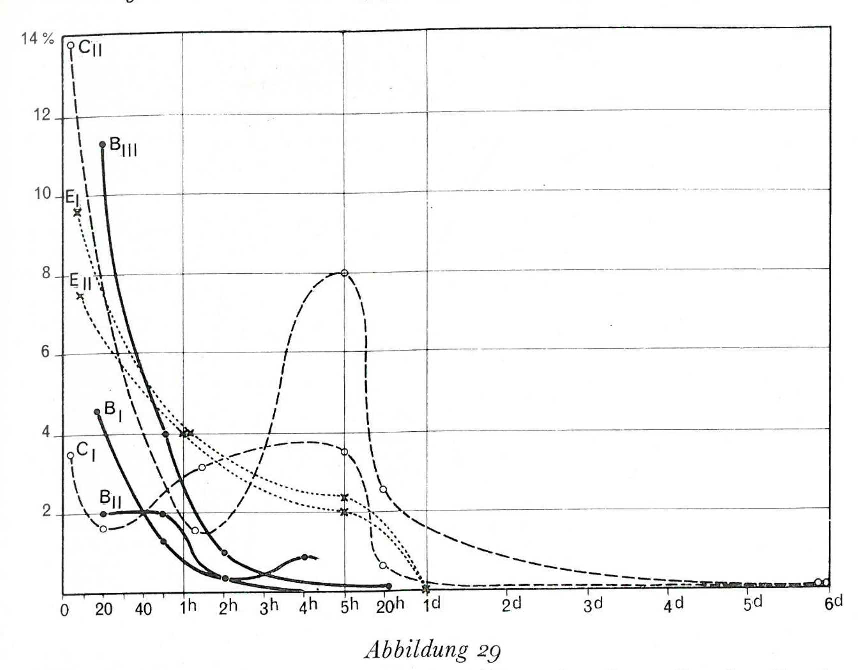


Abbildung 29

Abnahme der durch Vitalspeicherungen markierten homologen Spenderzellen im Peritonealexsudat. Das Gros der fremden Zellen verschwindet innerhalb der ersten Stunde nach der Injektion.

Aussagen über einen fermentativen Abbau waren aus der Versuchsanordnung nicht möglich. In der kurzen Zeitspanne, in der das Verschwinden der Spenderzellen im wesentlichen stattfindet, ist ein extrazellulärer fermentativer Abbau auch kaum denkbar.

2. Artfremde, organfremde Zellen

Die oben beschriebenen Versuche betrafen artgleiche, organgleiche Einzelzellen. Von praktischem Interesse war die Prüfung der Verhältnisse bei Injektionen körperfremder, organfremder Gewebe unter den gleichen Versuchsbedingungen. Dazu wurden ungefärbte, durch ihre morphologischen Eigenarten leicht erkennbare Gewebe (Siccacellpräparate) wie Knorpel-, Nieren- und Placentagewebe verwendet. Die Gewebe wurden in Ringerlösung suspendiert und in Mengen von 2,5 cm^3 (50 mg Trockensubstanz) intraperitoneal injiziert.

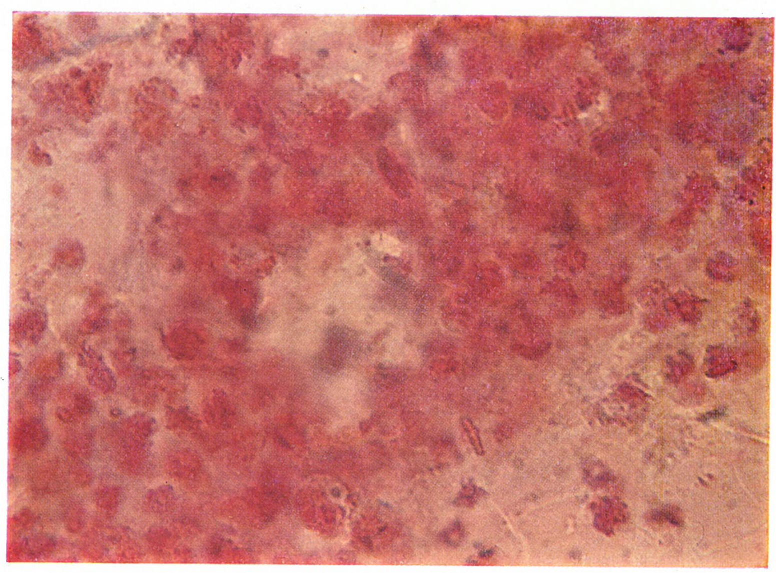


Abbildung 30
Speicherung von Kongorot in den Zellen des Omentums.

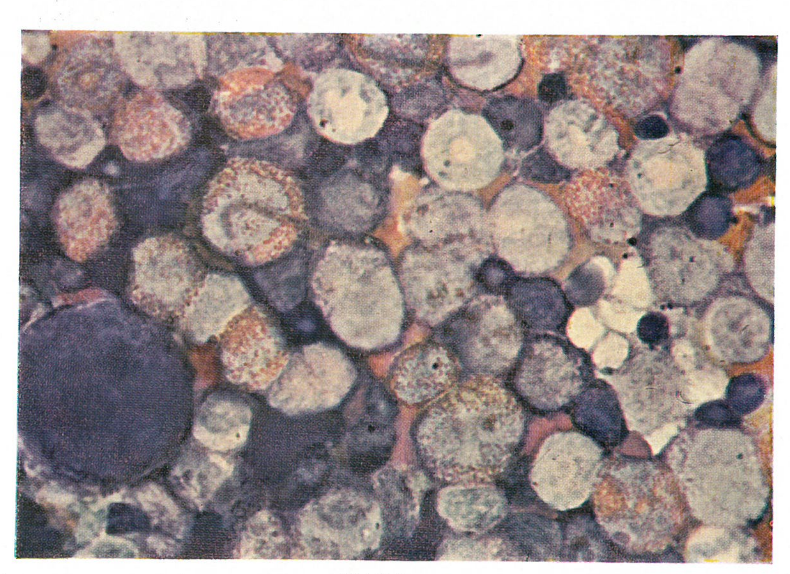


Abbildung 31
Verteilung von Eigen- und Fremdzellen in der Milz. Blau = Eigenspeicherung mit Trypanblau, Rot = Fremdzellen mit Kongorotspeicherung.

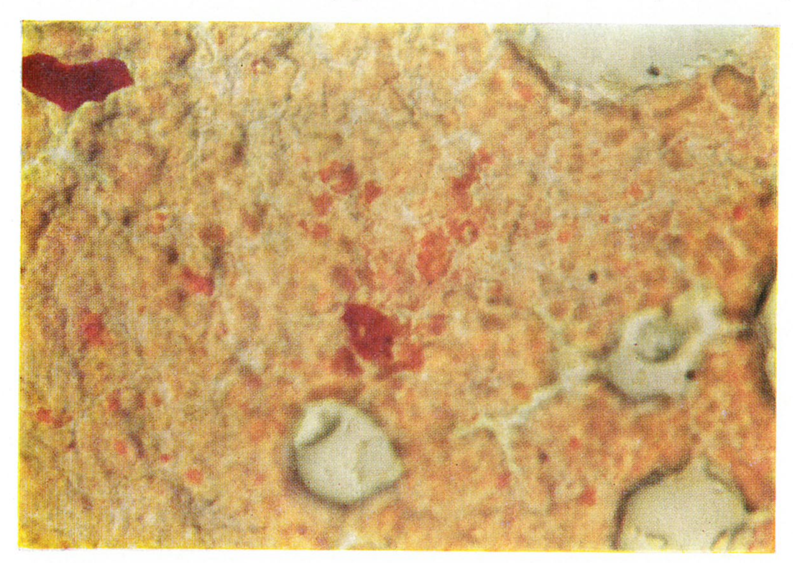


Abbildung 32
Ablagerung von vitalfarbstoffbeladenen Zellen im Thymus.

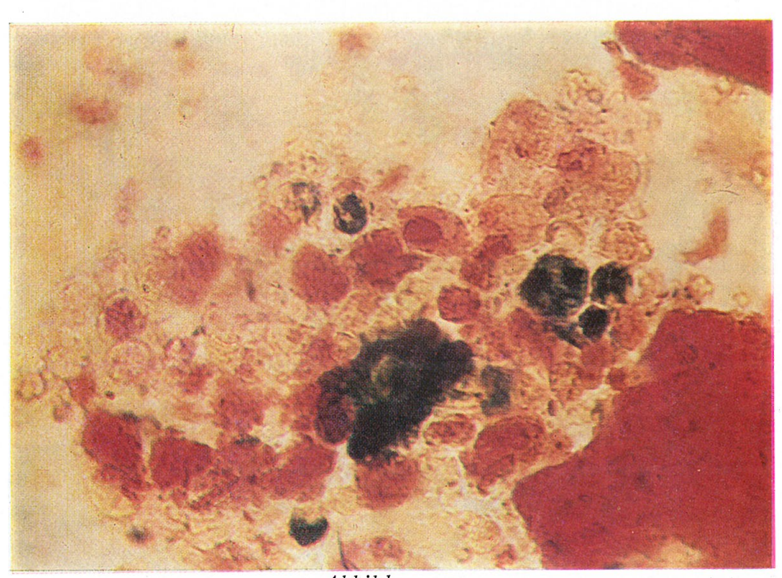


Abbildung 33
Verteilungsmuster zwischen Eigenzellen (Kongorotspeicherung) und homologen Fremdzellen (Trypanblauspeicherung) 30 Minuten nach Injektion der Fremdzellen. Auramingegenfärbung zum Nachweis der Zellen ohne Speicherung.

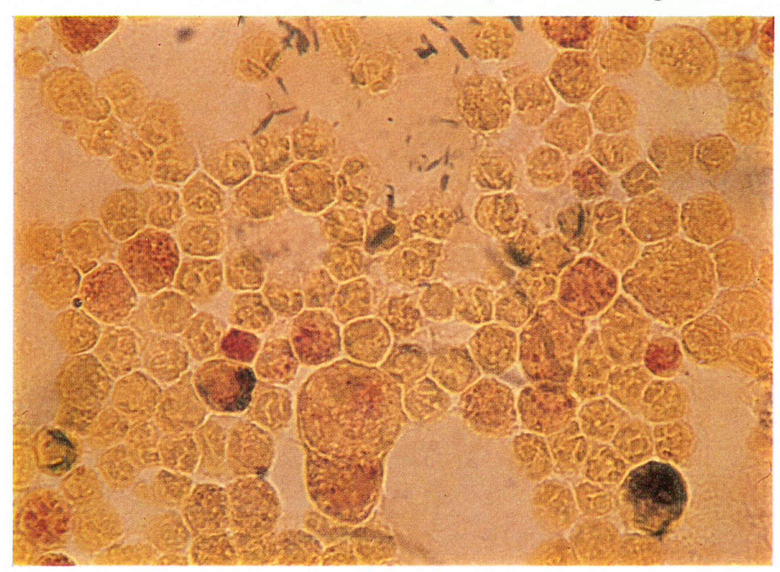


Abbildung 34
Verteilungsmuster von vitalgespeicherten Eigenzellen (Kongorot) und homologen Fremdzellen (Trypanblau) 5 Stunden nach Injektion letzterer.

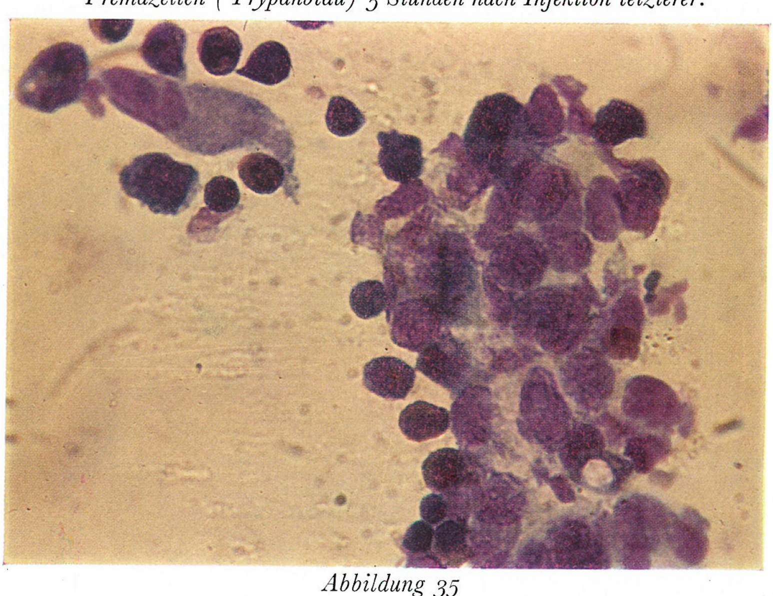


Abbildung 35
Umlagerung eines Stückes von lyophilisiertem Fetalnierengewebe (große Kerne – hellere Farbe) durch körpereigene mononucleäre Zellen. Palisadenförmige Anordnung letzterer.

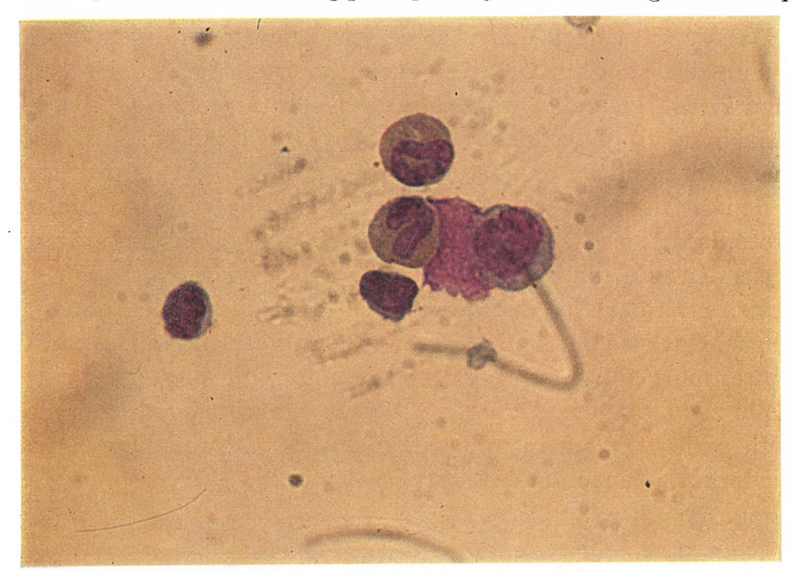


Abbildung 36
Phagocytose eines Restpartikels von fetalem Nierengewebe durch 2 körpereigene Zellen. 1 Woche nach Injektion der Zellengewebe.

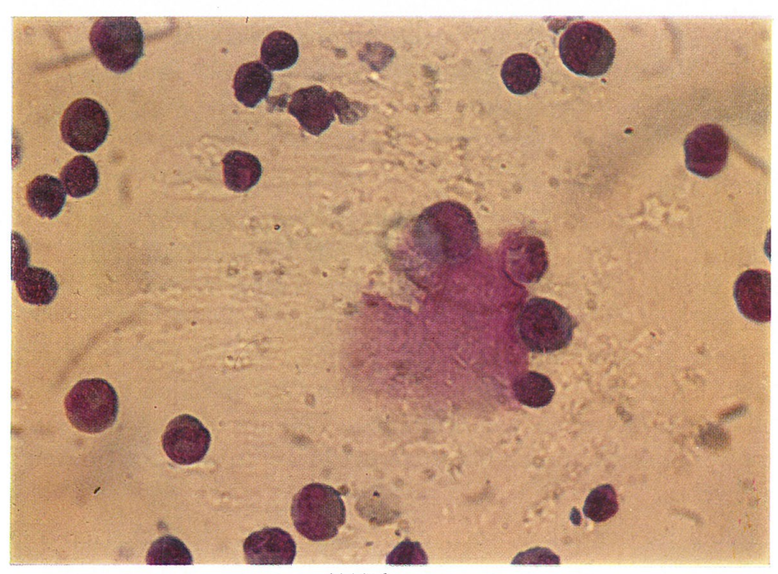


Abbildung 37
Körpereigene Zellen mit basophilem Plasma haben sich in den Gewebsrest eines fetalen Nierenpartikels «eingefressen».

Das Verschwinden dieser Zellkomplexe aus dem Injektionsraum scheint den gleichen Gesetzen zu unterliegen, die bei den artgleichen Zellen gefunden wurden. Da es sich um fetale Gewebskomplexe handelt, dauert der Abbau offensichtlich länger. Aus zahlreichen Einzelbildern ergaben sich Hinweise, daß die körpereigenen Zellen die Fremdgewebe umlagern (Abbildung 37, Abbildung 35), Protoplasmafortsätze (Abbildung 35) an oder in das Fremdgewebe entsenden und die Gewebskomplexe von der Peripherie her «auffressen». In der Auseinandersetzung des Körpers mit Fremdgeweben scheint also der Auflösung, dem parenteralen Abbau und dem Abtransport durch körpereigene Phagocyten die entscheidende Rolle zuzukommen. Daß körpereigene Makrophagen in der Lage sind, andere Zellen in toto aufzunehmen und abzubauen, wurde wiederholt beobachtet (Abbildung 52, 56).

Die fetalen lyophilisierten Trockengewebe wirken im Empfängerorganismus offensichtlich weniger «fremd», da sie kaum nennenswerte Zellbildverschiebungen zur Folge haben. Der antigene Reiz ist gering, die Bildung großer basophiler Zellen («Plasmazellen») bleibt aus oder abortiv. Tagelang (nachgewiesen bis zu 6 Tagen post inject.) können die Gewebskomplexe am Injektionsort liegen, wo sie langsam durch Phagocytose destruiert werden.

Der Abtransport

Durch die Vitalmarkierung war es möglich, den Verbleib der Eigen- und Fremdzellen zu verfolgen. Wenn organgleiche Fremdzellen (rasch) und Eigenzellen, die mit Farbe beladen sind (langsam) verschwinden, so erhebt sich die Frage, wohin der Abtransport erfolgt. Organuntersuchungen haben ergeben, daß die Zellen im Netz, Mesenterium, in Milz (Abbildung 31), Leber, Knochenmark, Thymus, Muskelfaszien, in den Gelenkhüllen sowie in den kollagenen Geweben von Schnauze, Füßen und Schwanz abgelagert werden, also in den Organen des lockeren und reticulären Bindegewebes.

Dabei ist bemerkenswert, daß sowohl die gespeicherten Eigen- als auch Fremdzellen abtransportiert werden, offensichtlich also auch die Eigenzellen vom Zeitpunkt der Speicherung ab als «organismusfremd» behandelt werden.

Zusammenfassende Wertung

Als Ergebnis der vorliegenden Versuchsserie kann festgehalten werden:

1. Durch Injektion eingebrachte Zellen oder Gewebspartikel verschwinden rasch – im Gros innerhalb einer Stunde – vom Ort der Injektion. Dabei ist es im Prinzip gleichgültig, ob es sich um artgleiche, organgleiche oder artfremde, organfremde, körperfremde Zellen handelt, das Tempo des Verschwindens ist verschieden.
2. Viele Anhaltspunkte sprechen dafür, daß das Verschwinden vom Injektionsort durch Abbau und Abtransport mittels Makrophagen vor sich geht. Für einen fermentativen Abbau erscheint die Zeit zu kurz, doch ist diese Frage aus der Versuchsanordnung nicht zu beantworten.
3. Die Ablagerung der vital gefärbten Zellen erfolgt im reticulären (Milz, Knochenmark, Thymus, Leber) und lockeren Bindegewebe (Kollagenareale, Gelenkhüllen, Muskelfaszien, Peritoneum, Mesenterium, Omentum). Daraus kann aus dieser Versuchsanordnung allerdings nur geschlossen werden, daß sie in artverwandten Geweben stattfindet.
   Weil die intraperitoneale Applikation eine Zwischenstellung zwischen intravenöser und intramuskulärer einnimmt, ist eine Einschränkung der Aussage notwendig. Bei der intramuskulären könnten möglicherweise fermentative Abbauprozesse eine größere Rolle spielen, im Prinzip sind jedoch auch dafür die gleichen Abbau- und Verteilungsmechanismen anzunehmen.
4. Alle Teilergebnisse sprechen dafür, daß die Fremdzellen nicht in toto wirksam werden können, sondern vermutlich in Bestandteilen des Zelleibes und Zellkernes.



Immunologie



Allgemeine Betrachtungen zur Immunologie der Therapie mit Zellen und Geweben

VON PROF. H. G. RIETSCHEL, HERFORD

I. Anwendungsformen von Geweben

Transplantation

Unter Transplantation versteht man die Überpflanzung körpereigenen oder fremden Gewebes der gleichen oder einer anderen Spezies. Von autoplastischer Transplantation spricht man, wenn das entnommene Gewebe dem gleichen Individuum entstammt, auf das es übertragen werden soll; von homoplastischer, wenn die zu verpflanzenden Gewebe oder Gewebsteile von einem Individuum der gleichen Spezies herrühren, während Heterotransplantate Überpflanzungen auf eine andere Spezies sind.

Unter gewissen Voraussetzungen heilen Autotransplantate ohne größere Gewebsveränderungen zwischen Wirt und Transplantat ein; dagegen werden Homo- und Heterotransplantate im allgemeinen innerhalb weniger Tage abgestoßen. Die sich dabei abspielenden Vorgänge tragen den Charakter der allergischen Entzündung.

Die Transplantationslehre unterscheidet homostatische Transplantate, Gewebe mit überwiegend statischer Funktion, zu denen Blutgefäße, Knochen und Knorpel gehören, und homovitale wie Niere, Leber, Lunge, endokrine Organe und Haut mit spezifischer Organfunktion.

Transplantation von Geweben mit vitaler Funktion

Bevor Autotransplantate endgültig anheilen, machen sie eine «Entzündung» durch. Diese ist unspezifisch und hat nichts mit immunologischen Vorgängen zu tun, die ja wegfallen bei Übertragung von Geweben des gleichen Individuums von einem Ort auf einen anderen. Die Autotransplantation vitalen Gewebes hat beim Menschen in erster Linie praktischen Wert bei der Überpflanzung von gesunder auf verletzte Haut, wie zum Beispiel bei Verbrennungen oder schweren entzündlichen Defekten. In Anlehnung an Tierversuche von Helene TOOLAN versuchte SNYDERMAN (1958), Haut mensch-

licher Feten aus den ersten 4½ Monaten der Schwangerschaft auf Hautdefekte bei Patienten zu übertragen. Von 8 Fällen waren 4 von Erfolg gekrönt. Der Autor glaubt – obwohl dieser Methode noch erhebliche Schwierigkeiten im Wege stehen –, daß ihre weitere Erprobung lohnenswert sei, da sie bei schweren kindlichen Verbrennungen unter Umständen lebensrettend wirken könne. Ähnliche Untersuchungen sind von PEER unternommen worden, der bei Verbrennungen Hauttransplantate von der Mutter auf das Kind übertrug. Er ging dabei von der Annahme aus, daß eine größere Aussicht auf Einheilung mütterlicher Transplantate bestünde als solcher vom Vater. Das könne vielleicht damit zusammenhängen, daß das Kind im fetalen Leben der Einwirkung mütterlicher Stoffe (Antigene?) ausgesetzt sei. Die Vornahme einer Probetransplantation von Haut sieht er als brauchbaren Test dafür an, ob eine zukünftige Übertragung von anderen Geweben oder Organen (Niere, endokrine Drüsen) erfolgversprechend sei. Um die spätere Verträglichkeit von Hauttransplantaten des Elternpaares bei Hautverletzungen oder Verbrennungen frühzeitig zu erproben, hat WOODRUFF bei zwei Neugeborenen jeweils etwa 300 Mill. weiße Blutkörperchen beider Eltern intramuskulär verabreicht. Sechs Monate später wurde jedem Kind ein kleines Hauttransplantat beider Eltern übertragen. Während der ersten 4 Wochen verhielten sich die Pfröpflinge wie Autotransplantate. Dann begannen Absterbeerscheinungen, die nach 8 Wochen zu einem Untergang der Transplantate führten. Die klinischen Möglichkeiten, Transplantate von Eltern auf Kinder zu übertragen, sind – trotz genetischer Verwandtschaft – vorläufig noch gering, weil die für die jeweils sich abspielenden immunologischen Vorgänge verantwortlichen Antigene nicht spezies- oder organspezifisch, sondern individual-spezifisch sind.

Merkwürdigerweise verhalten sich Transplantate ganzer endokriner Drüsen oder Teile derselben anders als Haut- und Organtransplantate. Dies hängt zum Teil damit zusammen, daß endokrine Drüsengewebe nur geringe antigene Qualitäten besitzen und deshalb keine oder nur geringe Antigen-Antikörper-Reaktionen auslösen. Das gilt beispielsweise für Nebenniere und Parathyreoidea. Wie GAILLARD ausführt, haben Gewebe, die ein großes eigenes Regenerationsvermögen besitzen, bei Transplantationen eine größere Chance zu überleben. Der gleiche Autor weist darauf hin, daß em-

bryonale Transplantate besser einheilen, weil sie weniger oder keine Antigenqualitäten besitzen im Vergleich zu Geweben adulter Organe. GAILLARD zitiert Untersuchungen von Paul BERT, der embryonale Ovarien von Kaninchen und Hühnchen mit gutem Erfolg übertrug und sie zur Einheilung brachte. Dabei ist der gewählte Ort, der eine ausreichende Versorgung des Transplantates mit Sauerstoff und Nährstoffen garantiert, von größter Bedeutung, weil eine Gefäßneubildung in dem Transplantat nicht stattfindet und dieses sonst abstirbt. In eigenen Untersuchungen verwendete GAILLARD Epithelkörperchengewebe aus menschlichen Feten. Das Gewebe wurde zerschnitten und in Kulturen gebracht, denen Blutserum des späteren Empfängers zugesetzt war. GAILLARD berichtet über einen Fall von schwerer Tetanie im Anschluß an eine Schilddrüsenoperation, bei dem mehrere Fragmente von gezüchteten, fetalen Epithelkörperchen auf die Mesotestis transplantiert wurden. Es kam zur klinischen Heilung mit Normalisierung des Kalzium-Phosphatspiegels über 5 Jahre. Bei 38 in dieser Weise behandelten Patienten war es notwendig, die Transplantation ein- oder mehrfach zu wiederholen. Die Erfolge waren wechselnd. In einem großen Teil der Fälle war das Ergebnis negativ und die Transplantate starben ab. JONES studierte das Problem der Übertragung endokriner Transplantate an erwachsenen Ratten. 86 adrenalektomierte Tiere erhielten Nebennieren-Transplantate neugeborener Ratten; 22 überlebten und zeigten ein Angehen der Pfröpflinge über viele Monate. In Untersuchungen von KROHN an sogenannten F_2-Mäusestämmen, die ovarieektomiert waren, zeigte sich in 105 Fällen, bei denen die Ovarien neugeborener CBA-Mäuse übertragen worden waren, daß nur neunmal das Transplantat mehr als 100 Tage überlebte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Ovariumgewebe doch relativ große Antigenqualitäten besitzt, obwohl von KATSCH auf die Antigenarmut des Eierstockgewebes hingewiesen worden ist.

In diesem Zusammenhang sollen Untersuchungen von BING, CHIBA, CHRYSCHOU und WOLFF erwähnt werden, die sich mit der Transplantation ganzer Herzen in Anlehnung an die Versuche des Russen SINITSYN beschäftigen, die später von MARCUS in den USA fortgesetzt wurden. BING und seine Mitarbeiter erwähnen, daß drei Methoden der Herztransplantationen möglich sind. Bei der ersten werden die Coronar-Arterien des übertragenen Herzens an Herz-

kranzgefäße des Empfängers angeschlossen; bei der zweiten wird die Durchblutung der Coronarien durch die Tätigkeit des linken Ventrikels des transplantierten Herzens selbst aufrechterhalten. Die dritte Art der Transplantation ist technisch die schwierigste. Hierbei wird nicht nur das Herz, sondern auch die Lunge mit übertragen, so daß im Empfängerorganismus beide Organe ersetzt werden. In eigenen Untersuchungen über dieses Problem haben BING und Mitarbeiter festgestellt, daß bei Überpflanzung von Hundeherzen in Hunde einer verwandten Spezies eine Pancarditis granulomatöser Art beobachtet wird, die derjenigen, die man beim rheumatischen Fieber beobachtet, sehr ähnlich ist. Die ersten entzündlichen Veränderungen wurden 19 Stunden nach der Übertragung beobachtet. Es kam zu einer Myocardnekrose mit interstitiellem Ödem und Leukocyteninfiltration, die auch dann festzustellen war, wenn die Homotransplantate relativ lang – bis zu 47 Tagen – überlebten.

Zahlreiche Experimente und große Anstrengungen wurden unternommen, um das Problem der Übertragung einer ganzen Niere zu studieren. Alle Versuche der verschiedensten Autoren schlugen fehl, homotransplantierte Nieren am Leben zu erhalten, deren Gefäße mit denen des Empfängers verbunden wurden. Erst SIMONSON und DEMPSTER (zitiert bei MERRILL) haben an Hunden die technischen, klinischen und pathologisch-anatomischen Grundlagen der Homotransplantation der Niere geschaffen. Sie konnten feststellen, daß – bei einem Überleben des Transplantates bis zu acht Tagen – entzündliche Erscheinungen an den Glomeruli der übertragenen Niere nicht auftraten. Dagegen kam es immer zu einer interstitiellen Entzündung mit Einwanderung von Plasmazellen und Lymphocyten. Eine große klinische Tat bedeutete die Übertragung einer menschlichen Niere auf einen anderen Menschen durch HUME, MERRILL, MILLER und THORN (1955). In neun Fällen wurde die transplantierte Niere in die Leistenbeuge des Empfängers eingepflanzt und durch arterielle und venöse Verbindung an die Gefäße des Wirtes angeschlossen. Erstaunlicherweise waren die immunologischen Abwehrreaktionen des Empfängers wesentlich geringer als in den vorausgegangenen Tierversuchen von SIMONSON und DEMPSTER. Es kam erst nach etwa fünfeinhalb Monaten zu einer Abstoßung des Transplantates, nachdem vorher eine signifikante Verminderung der Azotämie mit ausgesprochener klinischer Besserung

stattgefunden hatte. Die Autoren haben keine sichere Erklärung für die Verzögerung der immunologischen Vorgänge. Sie nehmen aber an, daß die schwere Nephropathie ein Grund für die erhebliche Abschwächung der Antigen-Antikörper-Reaktionen sein könne. 1956 gelang es John MERRILL als erstem, die Niere eines eineiigen Zwillings auf den Partner, der ein schweres Nierenleiden hatte, mit Erfolg zu transplantieren. In einer Arbeit aus dem Jahre 1959 erwähnt der Autor, daß die drei Jahre zuvor übertragene Niere voll funktioniere, nachdem einige Zeit nach der Überpflanzung die beiden Schrumpfnieren operativ entfernt worden waren. Inzwischen sind in elf anderen Fällen bei eineiigen Zwillingen Nierentransplantationen ebenfalls mit Erfolg vorgenommen worden (MURRAY zit. bei MERRILL). In einem Falle kam es durch einen technischen Fehler zum Exitus. Zwei Patienten starben an fortschreitender Urämie, bevor die transplantierte Niere in Funktion treten konnte.

Vor kurzem ist in der «Presse médicale» (März 1962) die erste, über längere Zeit gelungene Homotransplantation einer Niere auf einen 37jährigen Patienten mit chronischer Nephropathie mitgeteilt worden (HAMBURGER, VAYSSE, CHROSNIER, AUVERT, DORMONT). Wegen der grundsätzlichen Bedeutung dieses Falles soll auf die Krankengeschichte des Patienten näher eingegangen werden.

37jähriger Patient mit chronischer Nephropathie seit 8 Jahren, hochgradige Zeichen der Azotämie, schwerste Nierenfunktionsstörungen (Clearence, P.S.P.-Test, Anämie mit 2,8 Mill. Erythrocyten), RR 180/130, erhebliche Augenhintergrundveränderungen.

Am 29. Juni 1959 Transplantation einer Niere seines Bruders, der kein Zwilling war. Feststellung unterschiedlicher Eigenschaften der Blutgruppen und der Leukocytenantigene der Brüder. Vor der Transplantation radiologische Behandlung des Empfängers mit 400 r, 7 Tage. Einpflanzung der Niere in die Fossa iliaca dextra. Verbindung der Arteria hypogastrica des Empfängers mit der Nierenarterie des Spenders, der Nierenvene des Spenders mit der Vena iliaca externa des Empfängers.

Klinische Beobachtungen

1. Stadium: Absinken der Zahl der Blutzellen als Folge der Röntgenbestrahlung. Funktionelle Erholung der transplantierten Niere in den ersten 14 Tagen mit Besserung der Blut- und Urinwerte.

2. Stadium: Zwischen dem 15. und 22. Tag langsame Verschlechterung der Nierenfunktion mit Wiederansteigen der Reststickstoffwerte im Blut, Eiweißausscheidung im Urin und Veränderung der Clearence-Werte.

3. Stadium: Nach dem 22. Tag fortschreitende Besserung, enorme Ausscheidung harnpflichtiger Stoffe. 3 Monate nach der Transplantation RR 140/90, fortschreitende Besserung mit Verschwinden der Ödeme, Ansteigen der Erythrocyten auf 4,08 Mill. Leukocyten 4800, davon 61 % Granulocyten. Thrombocyten 280000. Fehlen von krankhaften Bestandteilen im Urin, weitgehende Normalisierung der Clearence-Werte.

Am 31. Januar 1960 Exstirpation der linken, am 17. Februar 1960 der rechten eigenen Niere. Befund: schwerste atrophische Schrumpfnieren. Nierenbiopsie der transplantierten Niere zeigt normales Glomerulus- und Tubulusepithel, dagegen im Interstitium und unter der Kapsel entzündliche mononucleäre Infiltrate. Im Anschluß an die doppelte Nephrektomie erst Absinken des RR. Seit April 1960 Erhöhung der RR-Werte auf 175/115, im Dezember 1960 auf 205/115.

Erneute Klinikaufnahme. Retrograde Pyelographie der transplantierten Niere und Feststellung urographisch normaler Verhältnisse. Seit Februar 1961 streng salzlose Kost, Blutdruck im Mittel 170/100, befriedigender Zustand im Januar ohne Eiweißausscheidung im Urin.

Im Falle eines 21jährigen Mädchens mit chronischer Urämie erfolgte ebenfalls Transplantation einer Niere von der 19jährigen, genetisch nicht identischen Schwester am 30. Mai 1960. Beim Versuch, die kranken Nieren im November 1960 operativ zu entfernen, wurde vorher zum immunologischen Schutz eine Röntgenbestrahlung durchgeführt. Staphylokokkensepsis, Exitus am 3. Dezember 1960.

Im 3. Fall wurde die Niere einer Mutter auf die an Urämie erkrankte Tochter mit Erfolg transplantiert. Die Überlebenszeit ist noch zu kurz, um Aussagen über den klinischen Erfolg machen zu können.

Bemerkenswert ist die Mitteilung von J. C. Pierce und R. L. Varco (Lancet 1962) über die Transplantation einer Niere eines 20 kg schweren Hundes auf ein blutfremdes, reinrassiges Tier von 12 kg Gewicht, unter dem Schutz von Purinethol (6-Mercaptopurin). 6 beziehungsweise 7 Monate nach der Überpflanzung wurden dem Hund beide eigenen Nieren operativ entfernt. Die fremde Niere übernahm deren Funktion vollständig. Einige Zeit später wurden die Injektionen mit Mercaptopurin eingestellt. Die Fremdniere funktionierte ausgezeichnet und der Versuchshund nahm 5 kg an Gewicht zu. Zehn Monate später lebte das Tier ohne Mercaptopurin mit fremder Niere.

Die Autoren schließen aus ihrem Versuch, daß die für homologe Organübertragungen notwendige Immuntoleranz auch bei erwachsenen Empfängerorganismen herbeigeführt werden könne. Dabei dürften drei quantitative Faktoren entscheidend sein:

1. Die Dosis des Hemmstoffes gegen die Abwehrreaktion,
2. die ausreichende Größe des überpflanzten Organs und
3. die Zeitdauer der Hemmung der Antikörperbildung.

Die gelungene Homotransplantation einer menschlichen Niere auf einen Nierenkranken stellt einen Höhepunkt dieses Forschungsgebietes dar. Vielleicht bietet sich für die Zukunft – wenn auch vorläufig in beschränktem Maße – die Möglichkeit einer echten Hilfe für Urämie-Kranke. Die zahlreichen experimentellen Untersuchungen aller Autoren, die sich mit diesem Problem beschäftigt haben, scheinen damit die ersten Früchte zu tragen.

Transplantation von Geweben mit statischer Funktion

Selbstverständlich gelten bei der Überpflanzung homo*statischer* Gewebe die gleichen immunologischen Gesetze wie bei der Übertragung auto-, homo- oder hetero-*vitaler* Transplantate.

Zu den statischen Geweben rechnen wir in erster Linie Knochen, Knorpel und Gefäße. Autotransplantate werden nur in den seltensten Fällen zur Anwendung kommen können. Zur Diskussion stehen also homo- und heteroplastische Verfahren, bei denen fremdes Material verwendet wird, dessen einzige Bestimmung es ist, eine feste Verbindung zwischen den Teilen eines zerstörten Gewebes wiederherzustellen. Es soll nicht auf die einzelnen Indikationen zur Anwendung entsprechend vorbereiteter Knochentransplantate – sogenannter Späne – eingegangen werden. Die Chirurgie bedient sich des Spongiosaknochens, des Anlegespans bei Frakturen, des Schiffchenspans bei Innenknöchelpseudarthrosis, des Keiles zur Gelenkunterpolsterung und des Stiftspans, der bei Verletzung des Radiusköpfchens beim Kind Verwendung findet. Knochen, Knorpel oder Gefäße müssen, bevor sie zur Deckung eines Defektes Verwendung finden, ihrer vitalen Eigenschaften beraubt werden. Dazu muß eine Enteiweißung erfolgen, um Immunisierungsvorgänge zu verhindern. In den letzten Jahren wurde von R. MAATZ und A. BAUERMEISTER aus Tierknochen der sogenannte «*Kieler Knochenspan*» entwickelt, der ein biologisch hochwertiges heterologes Knochentransplantat darstellt, das in enormem Ausmaß die Knochenbildung des Empfängers anregt. Es handelt sich um Knochen, die einem «Prozeß der Auflösung von Knochenweichgeweben, einer Eiweißdenaturierung der Hartsubstanz, einer Entfettung und Sterilisation» unterworfen werden. Hierbei bleiben wertvolle biologische Eigenschaften erhalten. Gleichzeitig wird das Transplantat im immunologischen Sinne entgiftet, so daß Abwehrreaktionen des Wirtes feh-

len. Als toter Knochen besitzt dieser Span nicht mehr die Fähigkeit, aus eigenen Kräften Knochenzellen zu bilden. Da, wo er mit knochenbildungsfähigem Gewebe in Kontakt kommt, regt er dieses zur Kallusbildung an.

In ähnlicher Weise hat man Gefäße vorbereitet und zur Deckung von Defekten mit zum Teil ausgezeichnetem Erfolg verwendet. Das Studium der Arterien- oder Venentransplantationen hat gezeigt, daß die Übertragung von Blutgefäßpfröpflingen mit noch lebenden Gewebszellen zu ihrer Zerstörung durch den Empfängerorganismus innerhalb von drei Wochen führt. Dagegen bleibt das elastische Gewebe mindestens für zwei Jahre erhalten. Innerhalb eines Monates ist das Gefäßtransplantat durch fibröses Gewebe umschlossen, und neue endotheliale Zellen wachsen von den Enden der Gefäßteile des Wirtes ein. Es ist zur Zeit noch nicht möglich, den wirklichen Wert von Gefäßtransplantaten zu beurteilen, weil zum Teil eine frühzeitige Kalkeinlagerung in die Intima einiger der Gefäßpfröpflinge stattfindet, und die Entwicklung eines dichten, fibrösen Gewebes in der Adventitia den Wert der Transplantation mindert. Die besten Ergebnisse scheinen mit enteiweißten Transplantaten erzielt zu werden. Die homostatischen Transplantate stellen also nichts anderes dar als eine tote Masse, die eine Verbindung zwischen zwei lebenden Gewebsteilen bildet.

Hornhaut eignet sich wegen ihrer Gefäßlosigkeit ganz ausgezeichnet zur Transplantation. In den Beobachtungen von OWENS (zit. bei LONGMIRE und Mitarbeitern) blieben unter 417 Hornhauttransplantaten 365 ohne Trübung. Der Erfolg der Corneaüberpflanzung hängt von verschiedenen Bedingungen ab: von der Durchsichtigkeit des Hornhautpfröpflings, von dem Grad der Vaskularisation und von der Vermeidung von Sekundärinfektionen. Je ausgesprochener die Undurchsichtigkeit des Hornhauttransplantates war, um so geringer waren die Erfolge. Ähnlich wie die Transplantate von Cornea verhalten sich die von Retina. ROYO und QUAY konnten an tragenden Long Evans-Ratten im Alter von 90–180 Tagen zeigen, daß die von ihren Feten gewonnenen Retina-Transplantate bei Einpflanzung in die vordere Augenkammer der Mutter in 89% voll und ganz einheilten. Auf die technischen Einzelheiten der Gewinnung und Aufbewahrung von Corneatransplantaten soll nicht näher eingegangen werden.

Etwas ganz anderes bezweckt die *Allo*plastik, bei der anorganisches Material übertragen wird. Hierbei fehlen immunologische Vorgänge; es werden lediglich Fremdkörperreaktionen ausgelöst, die unter Umständen zur Abstoßung des Transplantates oder Implantates führen können. Das Idealmaterial ist bis heute noch nicht gefunden. Unter den verwendeten Kunststoffen genießen vor allem Polyester und Akrylate den Vorzug, weil sie eine leichte Formbarkeit, Elastizität und eine relative Gewebsfreundlichkeit aufweisen. Sie haben andererseits aber nicht die Festigkeit von Metallen, die wiederum andere Nachteile aufweisen. Metalle werden hauptsächlich in der Unfallchirurgie als Nägel, Schrauben oder Platten verwendet. Auch in der Gefäßchirurgie werden außer homostatischen Gefäßtransplantaten Kunststoffe verwendet, die sich bewährt haben (H. BRUCK).

Transplantation wird am besten mit Überpflanzung bezeichnet, während Implantation «Einpflanzung» bedeutet, also Einbringung eines Pfröpflings in das Innere des Organismus[1].

Natürlich gelten die immunologischen Gesetze bei der Implantation von Gewebsteilen in gleicher Weise wie bei der Transplantation. Man hat gerade mit kleinsten übertragenen Zellverbänden – die vom eigenen Organismus, von einem anderen der gleichen Spezies oder von einem fremden stammten – die sich abspielenden unspezifischen Reizerscheinungen und die Antigen-Antikörper-Reaktionen besonders gut studieren können, weil die Verhältnisse bei sehr kleinen Objekten viel übersichtlicher sind. Auf diese Weise hat man die histologischen Vorgänge erfaßt und auch die Möglichkeit gehabt, Natur und Wirkung der Antigene besser zu erkennen und die Bildungsstätten der Antikörper aufzuspüren (siehe folgende Kapitel).

Das Angehen eines Implantates im eigenen oder fremden Organismus hängt von verschiedenen Bedingungen ab. Entscheidend ist der histologische Aufbau des eingebrachten Pfröpflings. Er wächst

[1] In der Literatur gehen allerdings die Bezeichnungen Transplantat und Implantat etwas durcheinander. Streng genommen ist die Einpflanzung einer Niere, die Einbringung von Teilen einer endokrinen Drüse oder eines ganzen inneren Drüsenorgans eine Implantation, doch wird hierbei im allgemeinen von Transplantation gesprochen. Der Begriff Implantat bezieht sich in erster Linie auf sehr kleine Gewebsstücke, während Transplantate größere Gewebsteile oder ganze Organe sind, die mit Gefäßanschluß eingepflanzt werden.

um so schlechter, je ärmer an Blutgefäßen sein Gewebe ist und je mehr Bindegewebe er enthält. Lungengewebe, Bindegewebe und vor allem Organteile mit homostatischer Funktion eignen sich daher nicht zur Implantation, während Teile der Parenchymorgane, endokrines Drüsengewebe und auch Milz besser zur Einpflanzung verwendet werden können. Es kommt auch bei autologer Implantation alles darauf an, die Ernährung des fremden Pfröpflings sicherzustellen, die dann am besten erfolgt, wenn das übertragene Gewebsstück möglichst dünn gehalten wird. Einheilungs- und Überlebensbedingungen sind in hohem Maße von der Durchblutung des Implantationsbettes im Wirt abhängig. Nicht jeder beliebige Ort im Empfängerorganismus ist zur Implantation geeignet.

Um ein Implantat an einem geeigneten Ort des Organismus zum Angehen zu bringen, ist es notwendig, die anfängliche Hypoxie-Periode infolge der noch nicht vorhandenen Gefäßversorgung des Pfröpflings zu überwinden. Es braucht einige Zeit, bis ein neuer Kreislauf zwischen Implantationsbett und Pfröpfling in Gang kommt, eine Zeit, die zwei Tage oder länger beträgt. Der Austausch, durch den ein Gewebe frische Nährstoffe und Sauerstoff aufnimmt, oder Abbauprodukte und Kohlensäure abgibt, erfolgt unter normalen Verhältnissen zwischen den betreffenden Zellen und der nächstliegenden Kapillare. Im Implantat ist in den ersten kreislauflosen Tagen ein Gas- und Stoffaustausch nur zwischen den Zellen des Implantats und den Kapillaren des Implantationsbettes möglich; denn seine eigenen Gefäße sind durchschnitten und außer Funktion. Je weiter die Kapillaren des Wirtes entfernt sind, um so verhängnisvoller wird sich die Langsamkeit auswirken, mit der die Diffusion in flüssigen und festen Medien arbeitet. Ist das Implantat groß und dick, so sind seine innersten Schichten in Gefahr zu verhungern, zu ersticken und durch Abbauprodukte geschädigt zu werden, bevor sie endlich von frischen Stoffen durch Diffusion erreicht werden. Es ist also notwendig, Implantate so dünn wie möglich zu halten.

Um die angeschnittenen Fragen zu klären, haben E. Knake und K. L. Engelbart Versuche mit autologen Schilddrüsenimplantaten am Kaninchen angestellt. Es wurden drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um die beste Form der Einheilung eines autoplastischen Implantates nachzuweisen. In der 1. Versuchs-

gruppe wurde als Wirtsbett das Omentum gewählt, in das dünne Scheiben von autologem Schilddrüsengewebe verpflanzt wurden. Alle Implantate heilten ein ohne Granulationsgewebe, durch einfache Verklebung und unmittelbare Verschmelzung dünnwandiger Gefäße zwischen Implantat und Wirt. Auf die erste schwere Schädigung, besonders am zweiten Tage, folgte schon vom dritten Tage an eine kraftvolle Erholung, die sich bis zum zwölften Tage auf alle reversibel geschädigten Bezirke auswirkte. In einer 2. Versuchsgruppe wurden unzerteilte Schilddrüsenlappen – also verhältnismäßig dicke Implantate – unter den Hautmuskel in der rechten Flanke auf die Körpermuskulatur gelegt. Diese Art der Implantation hatte schwere Schädigungen zur Folge. Die Implantate wurden von Granulationsgewebe eingehüllt. Am Rande gelegene Follikel erholten sich zwar durch frisches Blut, das durch Kapillarsprossung vom Granulationsgewebe herangeführt wurde und Granulationsgewebe sproß auch durch Lücken zwischen den erholten Randfollikeln. Aber die zentralen Partien des Implantates waren irreversibel geschädigt und gingen zugrunde. Das abgestorbene Drüsengewebe wurde ersetzt durch Narbengewebe. Als Endergebnis dieser Versuche konnte festgestellt werden, daß sich Follikelgruppen an den Rändern des Implantates erhalten hatten, während im Zentrum Narben und Fettgewebe gesehen wurde. Die Beobachtung erfolgte bis zu fünf Monaten. Bei der Versuchsgruppe 3 wurden bei größeren Kaninchen (1,5 bis 3,5 kg schwer) beide Schilddrüsenlappen bis auf einen schmalen Reststreifen reseziert. Von jedem Lappen wurden 4–5 rasiermesserdünne Schnitte entnommen und diese auf die Faszie der Körpermuskulatur 1–2 cm paravertebral in Rippenbogenhöhe nebeneinander implantiert. Die Implantate waren gleich dick wie in der Versuchsanordnung 1, aber das Implantationsbett hatte wesentlich schlechtere Ernährungsbedingungen. Deshalb folgte ein langdauernder Schwebezustand der Implantate zwischen Leben und Tod. Eine Erholung trat erst zwischen dem 12. und 22. Tag ein. Einige Teile der Implantate hatten überlebt, während andere bereits zugrunde gegangen und vernarbt waren. Eine Sekretstapelung in den erhaltenen Follikeln wurde nicht beobachtet.

Diese Versuche und viele andere lehren, daß das Überleben eines Autoimplantates im wesentlichen von der Dicke des Pfröpflings und

der Beschaffenheit des Implantationsbettes abhängt. Bei dickem Implantat und geschädigtem Wirtsbett erfolgt ein Anwachsen und Vernarben mit Massennekrose im Inneren und Granulationsgewebe, während dünne Implantate in einem unversehrten Bett ohne Vermittlung von Granulationsgewebe Anschluß an das Wirtsgewebe finden. Die Mesotestis und die Fossa iliaca sind Gebiete, die sehr stark vaskularisiert sind und sich für die Einheilung von Implantaten besonders gut eignen.

Zellulartherapie

Bei der von Paul NIEHANS inaugurierten Methode der Zellulartherapie werden Aufschwemmungen von Gewebsfragmenten, das heißt zerkleinerten Gewebsteilen, fetalen oder adulten Ursprungs der verschiedensten Organe von Tieren, dem Patienten intramuskulär gespritzt. Grundsätzlich haben wir mit den gleichen Antigen-Antikörperreaktionen zu rechnen wie bei der Transplantation und Implantation homo- oder heteroplastischer Gewebe – gleichgültig ob diese fetalen oder adulten Ursprungs sind. Aus zahlreichen experimentellen Untersuchungen und klinischen Beobachtungen scheint aber hervorzugehen, daß die immunologischen Reaktionen bei Verabreichung fetaler Gewebszellen geringer sind als bei Injektion von Gewebsteilen erwachsener Tiere. Daß Antigen-Antikörperreaktionen nach Gabe fetalen Zellmaterials vollständig unterbleiben, ist noch unbewiesen, auch wenn man berücksichtigt, daß gewisse Gewebe nur wenig antigene Qualitäten besitzen (Leber, Nebenniere, Ovarium usw.). Das Antigen-Mosaik eines Individuums scheint aber erst nach der Geburt vollständig zu sein und antigene Eigenschaften entfalten zu können.

Das Schicksal injizierter Fremdzellen, die Vorgänge bei ihrer Aufnahme und Verteilung im Wirtsorganismus, hat F. SCHMID eingehend untersucht und in einem Kapitel dieses Buches dargestellt.

Die Frage ist, was mit den injizierten Zellen oder ihren Teilprodukten endgültig geschieht. Paul NIEHANS hat folgende Hypothesen in Betracht gezogen:

1. «Die eingespritzten Zellen behalten ihre biologische Spezifität auch im neuen Organismus und wandern zu dem Organ, von dem sie selbst stammen, wenn dieses sie benötigt.»

2. «Die eingespritzten Zellen leben in der Muskulatur weiter, deren Blutgefäße ihnen Sauerstoff zuführen und die Exkrete abtransportieren. Also Weiterleben an der Einspritzungsstelle mit Fernwirkung auf das erkrankte Organ.»
3. «Die intramuskulär eingespritzten Zellen werden an der Injektionsstelle abgebaut und vom Organismus zur Unterstützung oder Heilung des entsprechenden Organes verwendet. Also Abbau und Verwendung des Materials zum Neuaufbau» (zit. nach NIEHANS).

Auf Grund der vorangegangenen Ausführungen ist die These eines Weiterlebens injizierter Zellen mit aktiver Wanderung zum korrespondierenden Organ oder Verbleiben am Einspritzungsort mit Fernwirkung auf entsprechende Organe noch nicht gesichert. Ein aktives Wandern von Zellen ist lediglich unter bestimmten experimentellen Bedingungen bei intravenöser oder intraperitonealer Gabe beobachtet worden, wobei offenbar gleiche Zellen ihr zugehöriges Organ erkennen und aufsuchen (LORENZ, FORD, Paul WEISS, G. ANDRES). Allerdings kann jede körperfremde Zelle durch Phagocyten passiv verschleppt und an anderen Stellen des Organismus abgelagert werden (F. SCHMID). Es ist durchaus denkbar und möglich, aber bisher unbewiesen, daß Teilprodukte der Zellen für die Regeneration bestimmter Organdefekte Verwendung finden. Mitochondrien und Mikrosomen sind für solche regenerative Wirkungen wahrscheinlich nicht verantwortlich zu machen, weil ihre Strukturen labil sind und nach intramuskulärer Gabe zerfallen. Auch ist an Co-Fermente gedacht worden, an andere unspezifische Stoffe der Zellen und vor allem an die für die Proteinsynthese der Zelle spezifischen Ribonucleinsäuren. Das sind alles Thesen, für die die Klinik bisher keine sicheren Stützen hat liefern können und die experimentellen Beweise noch nicht genügen.

Ein wesentlicher Effekt der Injektion fetaler oder adulter heterologer Zellen ist die Auslösung von Antigen-Antikörper-Reaktionen. Aus zahlreichen experimentellen Untersuchungen und klinischen Beobachtungen (RIETSCHEL) wissen wir, daß die auf diese Weise erzeugten immunologischen Reaktionen zu einer Aktivierung des rectiulo-endothelialen Systems – des sogenannten aktiven Mesenchyms – führen und klinisch das Phänomen der allgemeinen Erholung, der Revitalisierung (NIEHANS) auslösen. Zellen wirken als An-

tigene und führen zu einer Ausbildung von Antikörpern im Wirtsgewebe.

Gewebshydrolysate

Unter Gewebshydrolysaten versteht man Extrakte aus Geweben, die durch chemische Verfahren gewonnen werden. Gewebshydrolysate haben nur noch wenig mit den ursprünglichen Geweben zu tun. Durch Säure- oder Alkalihydrolyse bzw. durch fermentative Aufspaltung kommt es zu einer Aufschließung und zu einem Abbau chemischer Verbindungen. Die Polypeptidketten der Proteine werden aufgebrochen, so daß in Gewebshydrolysaten keine intakten spezifischen Proteine als Wirkungsträger der ehemaligen Zelle mehr zu finden sind. Leberpräparate enthalten ganz verschiedene Wirkstoffe. Die Präparate «Prohepar», «Campolon», «Hepatrat» und «Pernaemyl» unterscheiden sich grundsätzlich. Das «Prohepar» ist ein Hydrolysat aus Leber; einige Präparate enthalten die Gesamtwirkstoffe, wieder andere, wie das «Pernaemyl», sind mit Vitaminen (zum Beispiel Vitamin B 12) angereichert. Dieser unterschiedliche Wirkstoffgehalt hängt mit der Herstellungsweise zusammen. Ein Vergleich ist nur dann möglich, wenn durch eine exakte Testung die Kongruenz der Wirkstoffe gesichert ist. Über den Wirkungsmechanismus des «Prohepar» hat SCHWIETZER (zit. bei VORLAENDER) folgende Theorie aufgestellt: unter physiologischen Verhältnissen ist die Leber in der Lage, die Purinkörper ihrer Nucleinsäuren aus Ammoniak und niederen Kohlenstoffdonatoren zu synthetisieren. In der geschädigten Leber sollen die synthetisierenden Fermente diesen Anforderungen nicht mehr gewachsen sein. Die Leberzelle baut deshalb fertige Purine, vor allem Adenin, in die Nucleinsäuren ein. Nach tierexperimentellen Leberschädigungen findet man einen starken Zerfall der Nucleinsäuren. Die dabei auftretenden Zerfallsprodukte wurden von der Leberzelle nicht mehr verarbeitet, sondern als Adenin, Xanthin und Hypoxanthin im Harn ausgeschieden. Fermentstörungen kommen als zusätzliche Faktoren hinzu. «Prohepar» soll nun in der Lage sein – jedenfalls bei der experimentellen Tetrachlorkohlenstoffschädigung der Ratte –, diese Purinausscheidung im Harn zum Versiegen zu bringen und die Leberzelle zur Regeneration anzuregen. Die Befunde bei histologischen Untersuchungen sprechen in diesem Sinne. Nach dieser Auffassung ist das im «Prohepar» vorhandene Adenin nicht nur

Baustoff (Einbau in die neuzubildenden Nucleinsäuren) und Stimulans (Förderung der Zellregeneration), sondern auch Wirkstoff, da Adenin ein Co-Faktor verschiedener Enzyme sein soll (VORLAENDER).

Ein Gewebshydrolysat aus insulinfreiem Pankreasgewebe ist das «Nucleton». Es ruft deutliche Wirkungen auf den Stoffwechsel und Kreislauf hervor. Im «Corhormon» und «Recosenin» (Herzmuskelextrakte) ist reichlich Adenosin enthalten, ebenso wie in den aus quergestreifter Muskulatur gewonnenen Präparaten «Lacarnol» und «Embran». Nach Untersuchungen von MOHR und MÖLLHOFF, von KUSCHINSKI, BLÖMER, SCHIMMERT und WITZLEB, GOLLWITZER-MEYER und DONATH (zit. nach RIETSCHEL) mit der Reinschen Thermostromuhr erweitern diese Präparate die Herzkranzgefäße, steigern die Leistung des Herzens beim Schwimmversuch und stimulieren den Stoffwechsel, wodurch die Leber an Glykogen verarmt (MOHR und MÖLLHOFF).

Interessant sind die experimentellen und klinischen Ergebnisse mit Gewebshydrolysaten aus Keimdrüsen, wie sie im «Orchibion» und «Ovibion» vorliegen. Obwohl der Hormongehalt dieser Präparate unbedeutend ist, gelingt es doch, die Sexualentwicklung infantiler Ratten und Mäuse zu beschleunigen. Mit diesen Präparaten konnten jedoch keine gezielten Hormonwirkungen mittels Vaginatest bzw. Scheidenöffnungstest nachgewiesen werden. KOPPEN und TRÄM (zit. nach VORLAENDER) gelang es, bei reifen, weiblichen, kastrierten Kaninchen die Kastrationsveränderungen des Genitale und der Nebennierenrinde durch «Ovibion» und «Orchibion» rückgängig zu machen. Ebenso wirkten getrocknete Hodenzellen. Weibliche Sexualhormone in einer Dosierung, wie sie in Trockenzellpräparaten bzw. Drüsengewebshydrolysaten vorliegen, blieben jedoch ohne Wirkung. Diese Untersuchungen sind histologisch gesichert. Die Ergebnisse sprechen für besondere Wirkungen, die durch den Hormongehalt der Extrakte nicht erklärbar sind.

Aus diesen Beobachtungen lassen sich zusätzliche – über die immunologischen Reaktionen hinausgehende – Wirkungen ableiten. Sie könnten auch bei der Zellulartherapie darin bestehen, daß einzelne Substanzen die Regeneration unspezifisch oder spezifisch – zum Beispiel als Co-Faktoren – beeinflussen oder in Stoffwechsel-

vorgänge eingreifen. Auch wäre vorstellbar, daß die nach dem Abbau der Zellimplantate freigewordenen Substanzen ferment-chemische Prozesse anregen. Es ist durchaus nicht nötig, daß der Pathologe dann auch eine Regeneration des Gewebes als Beweis der Heilung feststellt. Jede Gewebeheilung ist nichts anderes als die Folge ungezählter einzelner «molekular-chemischer» Regenerationsschritte (DYCKERHOFF), die den wesentlichen Teilvorgang des Ganzen darstellen. Am Beispiel des mit Isotopen markierten «Nucleotons» wurde nachgewiesen, daß die verschiedenen Substanzen dieses Gewebshydrolysates resorbiert und in die Fermentkomplexe eingebaut werden (VORLAENDER).

II. Gewebearten

Trans- oder Implantation Auto-homo-heterologer Gewebe

1. Trans- oder Implantation autologer Gewebe

Die Gesetze der Anheilung von Auto-Transplantaten oder Implantaten sind bereits dargestellt worden. Je dünner ein überpflanztes Gewebe ist, um so besser sind die Aussichten zur Anheilung. Darum ist das zarte Epidermisläppchen von REVERDIN und THIERSCH weit besser zur Übertragung geeignet als die dicken OLLIERschen Hautlappen (ANDINA). Aber auch die beste autoplastische Überpflanzung eines Haut- oder Gewebsstückes geht nicht ohne Begleitentzündung ab. Dabei spielt sich grundsätzlich das gleiche ab wie bei der Wundheilung zweier Schnittflächen, die durch Absonderung von eiweißhaltiger Flüssigkeit zusammenkleben und dann verheilen.

Der erste Kontakt des Transplantates mit der Unterlage steht im Zeichen der Entzündung. Der Wundgrund sondert ein serofibrinöses Exsudat ab, aus dem sich nach mehreren Stunden ein Fibrinnetz bildet. Letzteres stellt die erste provisorische Verklebung des Pfröpflings mit der Wunde her. Die Dicke dieser Fibrinschicht kann sehr verschieden sein. Je ebenmäßiger und glatter die Wundfläche ist, desto besser kann der Lappen oder das Läppchen mit seiner Unterlage in Übereinstimmung gebracht werden und desto dünner bleibt auch die Fibrinlage. Neben mechanischen sind es vor al-

lem biologische Faktoren – die im einzelnen Fall sehr verschieden sein mögen – von denen die Einheilung des Transplantates abhängt. Die histologische Betrachtung zeigt eine exsudative Entzündung, zu der sich bald eine produktive gesellt, in der emigrative Vorgänge eine Rolle spielen. In die Maschen des Fibrinnetzes hinein erfolgt vom Wundgrunde her eine Einwanderung von Leukocyten, später von Lymphocyten. In späteren Stadien trifft man Monocyten und Plasmazellen an, die die Fibrinschicht durchsetzen und in das Transplantat eindringen. Daneben laufen degenerative Vorgänge am Epithel ab, die sich beispielsweise in der Basalzellschicht kundtun. Man sieht geschrumpfte Zellen mit kleinem Kern, während in der oberflächlichen Schicht des Epithels die Zellen oft blasig aufgetrieben sind. Diese Zeichen der Nekrobiose finden sich nur stellenweise und in wechselndem Ausmaß und bestimmen sehr stark das spätere Schicksal des Transplantates.

In der Lederhaut findet man im Prinzip dasselbe wie in den obersten Schichten; wenige Stunden nach der Aufpflanzung erscheint die Cutisschicht ödematös durchtränkt, auch die Gefäßläppchen der Haut weisen degenerative Veränderungen auf. Hand in Hand mit diesen Degenerationsvorgängen laufen aber Regenerationsbestrebungen, die am deutlichsten an den Gefäßen zu erkennen sind. Gefäße sterben ab, nehmen aber mit überlebenden Elementen Kontakt auf und bilden neue Gefäßrohre. Dabei dienen die Überreste der Gefäßverzweigungen des Transplantates gewissermaßen als Matrize. ANDINA hat nachweisen können, daß schon zwei Tage nach der Transplantation Gefäße des Läppchens mit Injektionsmasse gefüllt werden können. Die gleichen Regenerationserscheinungen werden nun am Epithel beobachtet, das von den seitlichen Rändern aus nach innen aufeinander zuwächst. Am Transplantat beobachtet man ein regeneratives Wachstum nach der Tiefe zu. Am sechsten Tag ist das histologische Bild durch die Organisation der fibrinösen Verklebungsschicht gekennzeichnet. Nun haben sich intakte Gefäßverbindungen – wie man in Serienschnitten nachweisen konnte – vom Wundgrund her durch die Verklebungsschicht bis in die Läppchen hinein verzweigt. Die akuten Entzündungserscheinungen sind am neunten Tage nach der Aufpflanzung so gut wie beendet, die Organisation ist weiter fortgeschritten. In den folgenden Tagen und Wochen überwiegen die regenerativen Vorgänge

gegenüber den degenerativen. Nach Wochen und Monaten unterscheidet sich das histologische Bild kaum vom normalen Gewebe. Auch die elastischen Fasern schwinden erst, um im späteren Stadium wieder zu erscheinen.

Natürlich stellt sich die Frage, warum sich die Haut im Gegensatz zu vielen anderen Gewebsarten zur freien Überpflanzung so gut eignet. Diese Fähigkeit liegt einmal in der Bedürfnislosigkeit der Epidermis – die bis zur Wiederherstellung der Gefäßverbindungen mit dem Wirtsgewebe durchhalten kann – und andererseits in ihrer großen Regenerationsfähigkeit. Die Eigenschaft, nicht im Stadium der akuten Entzündung vollends abzusterben, hängt im hohen Maße damit zusammen, daß die Epithelschicht nicht durchblutet ist. Die Blutgefäße reichen nur bis in die Spitzen der Papillen hinein und die Epithelzellen werden durch Diffusion ernährt. Das Erhaltenbleiben der Epidermis ist also an die Blutversorgung des Coriumanteils des Lappens gebunden. Wenn ein Hauttransplantat von beträchtlicher Dicke ist und neben der Epidermis auch die Coriumschicht enthält, ist die Chance zu überleben wesentlich geringer.

Grad und Ausdehnung dieser Entzündung hängen aber nicht nur von der Art des gewählten Transplantates ab, sondern vor allem auch – wie bereits ausgeführt – von der Beschaffenheit des Wirtsgewebes im Empfängerorganismus.

Es sei am Rande vermerkt, daß bei der Überpflanzung von Gewebstransplantaten sogenannte Auto-Antikörper entstehen können. Die entnommenen Gewebsstücke erleiden durch das Zerschneiden und durch fermentative Vorgänge eine Denaturierung vieler Eiweißstoffe. Dadurch werden Eiweißstoffe frei, die als Antigene (Auto-Antigene) wirksam werden können.

2. Trans- oder Implantation homologer Gewebe

Bei der Übertragung homologer Gewebe erfolgen Antigen-Antikörper-Reaktionen, die zu einem Absterben des Trans- oder Implantates führen. Bei Implantation eines Hautstückchens in einen Empfänger der gleichen Spezies an einem dafür geeigneten Ort beobachtet man in den ersten 8–10 Tagen histologisch keinen Unterschied gegenüber Auto-Transplantaten. Es kommt zu der bereits beschriebenen unspezifischen Entzündung. Das Gewebe erholt

sich wieder, aber nach dem achten bis neunten Tag treten Unterschiede im histologischen Bild des Homotransplantates gegenüber dem Autotransplantat auf. Im Pfröpfling wird der Blutstrom verlangsamt; es erscheinen intraarterielle Thromben; Kapillaren und kleine Blutgefäße gehen zugrunde und Blut tritt aus den Gefäßen aus. Der Pfröpfling erleidet eine Nekrose, die sich – je nach Dicke des Implantats und Ort der Implantation – verschieden rasch einstellt (Abbildungen 38 und 39). Dieser Vorgang ist von zahlreichen Autoren beobachtet und beschrieben worden (SHERWOOD-LAWRENCE). Die dabei ablaufende Entzündung entspricht dem proliferativ-chronischen Typ – von LETTERER als Spätreaktions- oder Tuberkulintyp bezeichnet –, bei dem zelluläre Vorgänge im Vordergrund stehen. Verabreicht man dem Empfängerorganismus, der bereits ein Transplantat bekommen hatte, einige Tage später ein zweites, so kommt es nunmehr zu Entzündungserscheinungen, die wesentlich rascher und intensiver ablaufen als diejenigen bei der ersten Überpflanzung. Die histologische Untersuchung dieses zweiten Pfröpflings (second implantation) zeigt im Gegensatz zum ersten exsudative Entzündungserscheinungen mit ödematöser Verquellung und Zurücktreten zellulärer Elemente (Arthus Phaenomen), (MEDAWAR, BRENT).

WAKSMAN hat sich besonders eingehend mit der Histologie der Abstoßung von Homotransplantaten beschäftigt. Er beobachtete um den fünften und sechsten Tag eine massive Infiltration bei Hautimplantaten mit Lymphocyten und Histiocyten und am 11. und 12. Tag bereits völlige Zerstörung des Pfröpflings. Die kollagenen Fasern des Transplantatgewebes blieben relativ verschont. Auch WAKSMAN unterstreicht die besondere Bedeutung von Lymphocyten, Plasmazellen und vor allem histiogener Elemente, die bei diesem Entzündungstyp vorherrschen. Bei zweitübertragenen Homotransplantaten sind hingegen die histologischen Geschehnisse schwierig zu deuten, weil der Zelluntergang, die Verquellung und die allgemeine Durchtränkung des Gewebes viel zu sehr im Vordergrund stehen, als daß man histologische Einzelheiten noch genau unterscheiden könnte.

Durch überzeugende Experimente hat SIMONSEN die immunologischen Reaktionen des Transplantates gegenüber dem Wirt nachweisen können: er injizierte intravenös bei Hühnchen*embryonen* eine

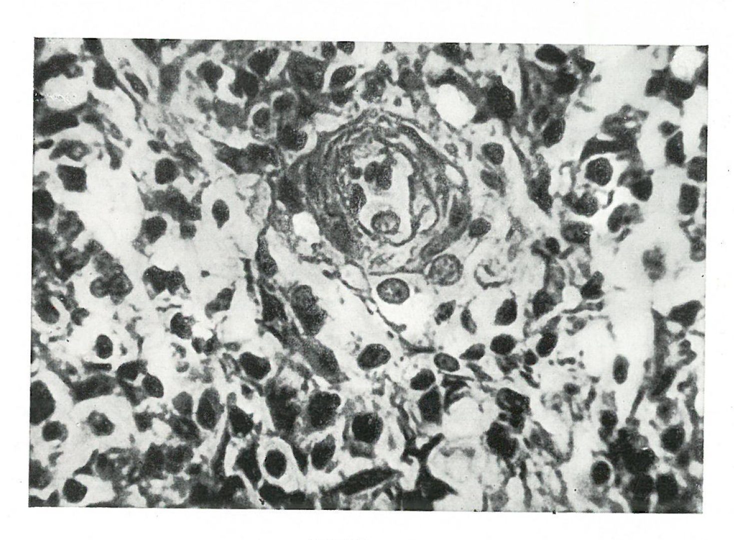


Abbildung 38
Homologes Milztransplantat, zwei Tage alt. Elastica aufgesplittert. Formol H.-E. 900 ×. (Aus Else Knake in Virchows Arch. path. Anat. 1955).

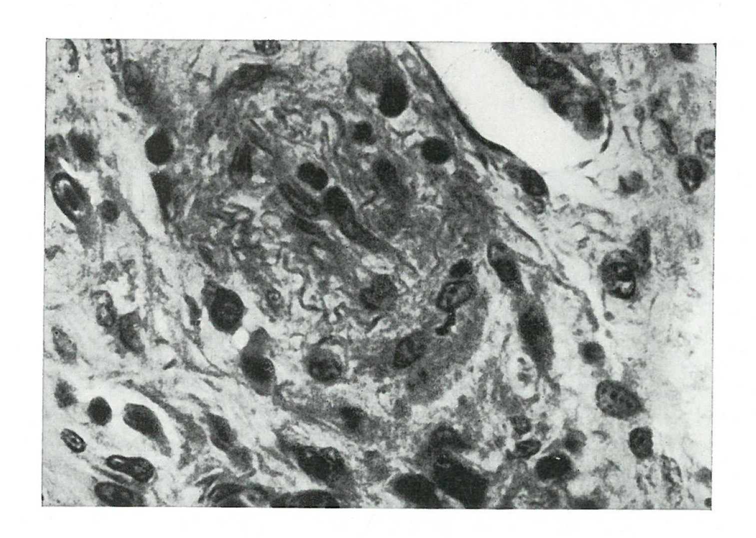


Abbildung 39
Homologes Milztransplantat, zehn Tage alt. Obliteration einer Arterie durch Fibroblastenwucherung ex vacuo. Formol H.-E. 855 ×.
(Aus Else Knake in Virchows Arch. path. Anat. 1955.)

Aufschwemmung erwachsener Hühnchenmilzzellen, 3 Tage bevor die Hühnchen zum Schlüpfen kamen. Es entwickelte sich eine schwere Erkrankung, die häufig in der 1. oder 2. Woche nach dem Schlüpfen tödlich endete. Das Krankheitsbild wies eine erhebliche Anämie auf; der Coombstest war in der Endphase der Erkrankung positiv, schwere Veränderungen fanden sich an der Milz, der Leber und dem Knochenmark sowie dem Thymus. Die Milz war stark vergrößert und zeigte Nekrosen und Haemorrhagien. SIMONSEN hat diese Reaktion des Transplantates gegenüber dem Wirt GVHA-Reaktion (graft versus host assay) genannt.

Runt disease

Dieses Krankheitsbild ist von den englischen Forschern (SIMONSEN, BILLINGHAM, MEDAWAR) Runt disease (Runt = Zwergrind) genannt worden, was so viel wie Kümmerwuchs-Krankheit bedeutet. Runt-Krankheit entsteht, wenn das Transplantat sich mit dem Wirtsgewebe immunologisch auseinandersetzt. Sie wird besonders häufig als Ausdruck einer GVHA-Reaktion bei Gabe von lymphatischen Zellen oder Milzgewebe beobachtet. Zu Kümmerwuchs kommt es, wenn die mit species-spezifischen, homologen Zellen inoculierten Tiere sich noch im embryonalen Zustand befinden, also nicht in der Lage sind, immunologisch zu reagieren. Die Tiere bleiben erheblich im Wachstum zurück, haben Entzündungen der Schleimhäute, sind an Schnauze und After wund und leiden häufig an schwerem Durchfall. Natürlich wird eine GVHA-Reaktion bei erwachsenen Tieren das Wachstum nicht mehr beeinflussen. Dafür dominieren andere klinische Erscheinungen des Verfalls: Milzschwellung, Anämie, hochgradige Hinfälligkeit, Freßunlust, bis schließlich ein Teil der Versuchstiere stirbt. Pathologisch-anatomisch manifestiert sich die Krankheit vor allem an den blutbildenden Organen und hier vorzugsweise am lymphatischen Gewebe. Man unterscheidet eine «*rote*» Kümmerwuchskrankheit mit hochgradiger Eindickung des Blutes und gesteigerter Gerinnungsfähigkeit und eine *blasse* Form des «Runt disease», mit dünnem und wäßrigem Blut. Dabei sind alle Gewebe stark anämisch, und das Knochenmark ist blaß und fibrös. Das lymphatische System spielt eine besondere Rolle beim «Runt disease». Das Blutsystem ist vorwiegend betroffen. Eine experimentelle Gabe von Lymphocyten

oder Milzzellen löst fast immer ein «Runt disease» aus, während nach Verabreichung anderer Gewebsarten die Kümmerwuchskrankheit nur vermindert auftritt oder ganz ausbleibt. Zu ihrer Auslösung braucht man bei erwachsenen Mäusen größere Mengen von Milzzellen (125 Mill. Milzzellen pro Gramm Körpergewicht/Maus) als bei neugeborenen Tieren (50000 Milzzellen pro Maus oder 30000 Lymphocyten pro neugeborenes Hühnchen). Es sind noch nicht alle Einzelheiten über das «Runt disease» bekannt, aber es ist sicher, daß es sich um eine Reaktion des Transplantates und seiner Antikörper gegen den immunologisch stummen Wirt handelt. Nicht nur die Antigene des Pfröpflings lösen eine Antikörperbildung im Empfängerorganismus aus – was zur Abstoßung des Transplantates führt –, sondern auch die Antikörper vom Transplantat wirken sich aus. Daraus läßt sich das schwere Krankheitsbild mit enormer Vergrößerung der Milz erklären.

Die Untersuchungen von Simonsen sind nicht die einzigen, die unternommen wurden, um die GVHA-Reaktion zu klären. Man hatte angenommen, nur das Transplantat enthalte die Antigene, die eine Bildung von Antikörpern im Wirtsorganismus auslösen. Aus der Grundlagenforschung zur Bluttransfusion war aber bereits bekannt, daß nicht nur die roten Blutkörperchen des Spenders mit dem Plasma des Empfängers zu Antigen-Antikörperreaktionen befähigt sind, sondern auch umgekehrt das Serum des Spenders mit den Erythrocyten des Empfängers immunologisch reagieren kann. Es lag daher nahe, das Transplantat zu untersuchen auf seine Fähigkeit, Antikörper zu bilden. Das ist möglich, wenn man Zellelemente, die Antikörperbildung auslösen, in einen embryonalen Organismus bringt, der immunologisch noch stumm ist.

Die starke Vergrößerung des lymphatischen Apparates, insbesondere der Milz, und der Nachweis zahlreicher Rundzellen, Lymphocyten, Plasmazellen und histiocytärer Elemente innerhalb des Transplantates legen die Vermutung nahe, daß dem Lymphknoten und der Milz eine besondere Bedeutung bei der Homo- und Heterotransplantation zukommt. Die Aktivierung des lymphatischen Apparates steht zweifelsohne mit den immunologischen Vorgängen im Zusammenhang. Diese können nur dann ablaufen, wenn die Vaskularisierung zwischen Wirtsgewebe und Transplantat und die Bildung von Lymphgefäßen zum Abfluß antigener Substanzen zu-

standegekommen sind (MERVIN und HILL, zitiert nach BRENT). Die Trans- oder Implantation eines Fremdgewebes führt zu einer Vergrößerung der dem Transplantat benachbarten Lymphknoten und der Milz. Bei Exstirpation der Lymphknoten aus der Nachbarschaft des Trans- oder Implantats verzögert sich die Abstoßung des Pfröpflings. In dem Falle schwellen entfernter gelegene Lymphdrüsen an, und die Milz vergrößert sich stärker.

Die im lympho-reticulären System ablaufenden immunologischen Reaktionen werden durch Antigene des Pfröpflings ausgelöst. Die Antigene gelangen über die Lymphwege in Lymphknoten und Milz, wo sie eine Aktivierung des gesamten lymphatischen Apparates, aber auch des aktiven Mesenchyms in Leber und Bindegewebe bewirken. Bei experimenteller Unterbrechung des Lymphstromes bleibt jede immunologische Antwort aus. Eine Verlängerung der Lebenszeit implantierter homologer Gewebsstücke hat man in der sogenannten porösen Kammer beobachten können. Durch Diffusion besteht eine Verbindung zwischen dem Implantat innerhalb der Kammer und dem umgebenden Gewebe, aber das Ein- oder Auswandern von Zellelementen wird verhindert. In dieser Versuchsanordnung können Antigen-Antikörper-Reaktionen nicht stattfinden, weil die das Antigen enthaltenden Zellelemente des Implantates keine Verbindung zu den antikörperbildenden Zellelementen des Wirtsgewebes haben (ALGIRE).

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt man bei Einpflanzung von Gewebsstücken in die Augenkammer oder in das Gehirn von Versuchstieren. Hier unterbleiben Antigen-Antikörper-Reaktionen, weil das Gehirn keinen Lymphkreislauf hat, der zur Auslösung immunologischer Reaktionen erforderlich ist.

Die Antikörperbildung gegenüber dem jeweils spezifischen Antigen (bei einer Transplantation wirken sicher zahlreiche Antigene) erfolgt im Wirtsorganismus wahrscheinlich durch unreife Plasmazellen, die im Zusammenwirken mit dem lymphatischen Apparat aus unreifen Gewebselementen des aktiven Mesenchyms gebildet werden. THIÉRY hat nachweisen können, daß ausgereifte Plasmazellen nicht mehr in der Lage sind, Antigene zu inkorporieren und Antikörper zu bilden; dies vermögen lediglich unreife Formen der Plasmazellen. Das Zusammenwirken von lymphatischem Apparat und Plasmazellen – die für die Antikörpersynthese unentbehrlich

sind – ist in seinen Einzelheiten noch nicht geklärt, doch sind folgende Tatsachen bekannt:

Plasmazellen entstehen aus einer reticulären Stammzelle, wie auch die Lymphocyten, jedoch sind die Ursprungszellen verschieden (Abbildungen 40 und 41). BERNHARD und GRANBOULAN haben bei Studien über die Ultrastruktur der unreifen Zellelemente der lymphocytären und plasmazellulären Reihe nachweisen können, daß der Lymphocyt immer aus einer schmal gebauten fixen reticulären Stammzelle entspringt, während die Mutterzelle der späteren Plasmazellen in Form, Gestalt und Herkunft anders ist und oft genug einer freien reticulären Stammzelle oder auch einer fixen aus Lymphknoten, Knochenmark, Kupfferschen Sternzelle oder Gefäßendothel entstammt (Abbildungen 42 und 43). Es werden folgende Stadien der Entwicklung durchlaufen: Reticuläre Zelle im Stadium der Freisetzung, freie Reticulumzelle, Haemohistioblast, Plasmoblast, reife Plasmazelle (Abbildung 44).

In Suspensionen von Lymphgewebe von Tieren, die mit antigenen Substanzen gereizt waren, fanden sich reichlich plasmocytäre Inseln und Nester von Plasmazellen in verschiedenen Stadien der Entwicklung. Es ist demnach wahrscheinlich, daß der erste Anstoß zur Antikörperbildung von Lymphocyten ausgeht, die antigene Substanzen enthalten. THIÉRY hat aber auch Aufnahme von Antigenen in unreifen Plasmazellen innerhalb von lymphatischem Gewebe beobachten können. Die Lymphocyten selbst sind nicht zur Antikörperbildung befähigt, sie haben nur wenig Plasmasubstanz, während die Plasmazellen – der Name sagt es – reich an Cytoplasma sind. Sie nehmen Substanzen auf, verarbeiten sie und stoßen neu gebildete Stoffe durch Freisetzung von Zellfragmenten oder durch Auflösung der Cytoplasmaorganellen aus. THIÉRY hat weiter nachweisen können, daß bei der Liberation von Stoffen aus dem Zellinnern unreifer Plasmazellen auch nucleäre Teilprodukte eine Rolle spielen (Abbildungen 45 und 46).

Die Bedeutung der Lymphocyten und Plasmazellen als Träger der Antigene ist in zahlreichen experimentellen Untersuchungen durch passive Übertragung der Immunität bewiesen worden (T.N. HARRIES und Susanna HARRIES). Die Überpflanzung von Lymphknoten – die aus der Nähe von Transplantaten stammten – auf andere Tiere ergab, daß auch im neuen Wirtsgewebe die Anti-

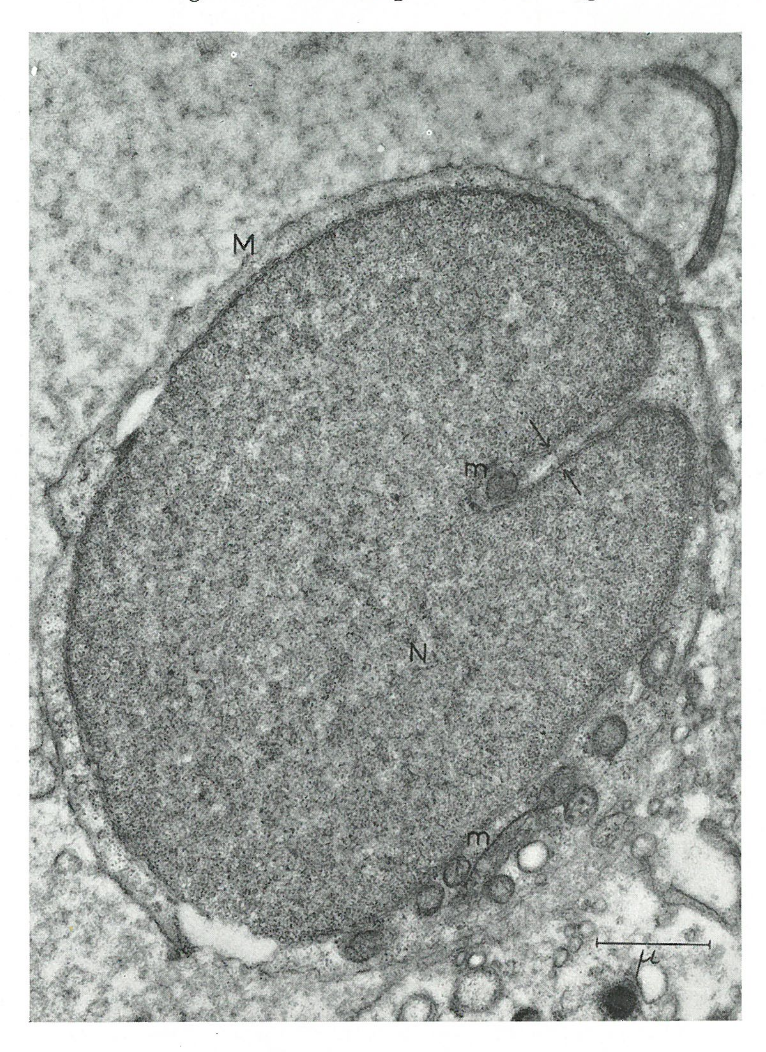


Abbildung 40

Kleiner Lymphocyt aus menschlichem Knochenmark mit sehr großem Kern. Die Pfeile zeigen auf die charakteristische Einkerbung des Kerns. Sehr wenig Cytoplasma. N: Nucleus; M: Kernmembran; m: Mitochondrien (× 14700). (Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd., London 1960.)



Abbildung 41

Plasmoblast aus menschlichem Knochenmark mit zahlreichen abgeplatteten Ergastoplasma-Lamellen (er). N: Nucleus; nu: Nucleolus; M: Mitochondrien (× 13560). (Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd., London, 1960.)

körperbildung in diesen Lymphknoten weitergeht und zu einer Immunisierung des Empfängers führt. Es steht damit außer Zweifel, daß bei der homologen Übertragung von Geweben Antigen-Antikörper-Reaktionen auftreten, die zu einer Aktivierung des lymphatischen Systems und der Zellen des gesamten reticulo-endothelialen Gewebes führen. Die Antigene aus dem Spendergewebe gelangen auf dem Lymphwege von den Pfröpflingen in das Wirtsgewebe und verbleiben in Geweben des lymphatischen Apparates, wo offenbar im Zusammenwirken mit Plasmazellen Antikörper gebildet werden. SHERWOOD-LAWRENCE hat zeigen können, daß Extrakte sensibilisierter Leukocyten das Immunitätsprinzip in sich tragen, gleichzeitig aber auch dazu befähigt sind, im neuen Empfängerorganismus Antikörper weiter zu produzieren.

Welcher Art sind die Antigene, mit denen wir es dabei zu tun haben? MEDAWAR (1959) unterscheidet einmal Antigene, die humorale Antikörper bilden (H-Antigene). Diese können vermittels

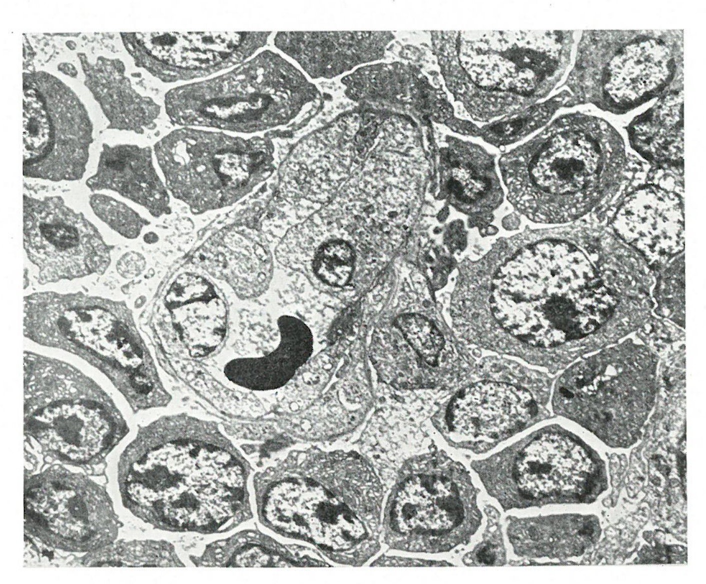


Abbildung 42

Nester von Plasmazellen aus Ratten-Lymphknoten, um eine Blutkapillare gelegen (Elektronenmikroskop).
(Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd., London 1960.)

Absorption durch entsprechende Immunsera nachgewiesen werden (Haemagglutinine, Haemolysine, Leukocytenagglutinine, Cytotoxine usw.). Sodann gibt es Antigene, die zur Transplantations-Immunität führen und von MEDAWAR T-Antigene genannt werden. Diese können nur durch biologische Methoden und nicht auf immunologischem Wege nachgewiesen werden. Das ist möglich infolge der Fähigkeit von T-Antigenen, eine Transplantationstoleranz zu erzeugen (BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR). Durch sinnreiche Untersuchungen zeigten diese Autoren, daß T-Antigene bereits bei 6 Tage alten Hühnchenembryonen nachzuweisen sind, ebenfalls bei 11 Tage alten Mäuseembryonen (BILLINGHAM und SILVERS). Wahrscheinlich zählen die T-Antigene chemisch zu den DNS-Substanzen in den Kernen. Nach neueren Untersuchungen handelt es sich dabei um Polysaccharide im DNS-Molekül. Über die chemische Natur der H-Antigene ist wenig bekannt. Untersuchungen von CANDUTSCH, REINERT-WENCK (MEDAWAR 1959) haben gezeigt, daß H-Antigene sowohl in Plasmafraktionen wie im Kern nachzuweisen sind. H-Antigene sind auch aus Mitochondrien und Mikrosomen isoliert worden.

An der genetischen Bedeutung einiger Antigene kann kein Zweifel sein. Schon frühzeitig (1910) hat sich Georg SCHÖNE mit dem gegenseitigen Austausch normaler Gewebe zwischen blutsverwandten Individuen befaßt. Bei Untersuchungen an Mäusen konnte er feststellen, daß Hauttransplantate am besten bei jungen, gleichgeschlechtlichen Geschwistern gelingen, daß aber auch eine Übertragung von Gewebsteilen fetaler oder jugendlicher Mäuse auf die Mutter möglich ist. Die ausgedehnten experimentellen Untersuchungen von SCHÖNE haben gezeigt, daß auch die homoplastische Transplantation bei blutsverwandten Tieren gelegentlich den Erfolgen der autoplastischen Gewebs- oder Organverpflanzungen gleichkommen. SCHÖNE hat damit als erster die Bedeutung der genetischen Verwandtschaft für das Gelingen von Übertragungen festgestellt und zukunftsweisend von einem verwandtschaftlichen oder biologisch identischen Verhalten gesprochen. In Parabioseversuchen an *Ratten* gelang es ihm, den Partner an die Antigene des anderen zu gewöhnen, um auf diese Weise später Organ- oder Hautüberpflanzungen von einem Individuum auf das andere und umgekehrt durchzuführen.



Abbildung 43

Lymphknoten eines Kaninchens. Bei kleinerer Vergrößerung sind die Strukturdifferenzen zwischen Plasmazellen und Lymphocyten sichtbar. P: Plasmazelle; L: Lymphocyt; Lb: Lymphoblast; CR: Querschnitt einer Reticulum-Zelle (× 7100). (Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd., London 1960.)

Bittner und Little (zitiert bei Brent) beschrieben Untersuchungen, in denen verwandte Mäusestämme in Bruder-Schwester-Inzucht miteinander gekreuzt wurden, bis schließlich ein Verwandtschaftsgrad erreicht war, der beinahe dem von monozygoten Zwillingen entsprach. So wurde es möglich, Transplantate von einem Tier auf ein anderes zu übertragen, ohne daß immunologische Reaktionen oder Transplantat-Zerstörungen stattfanden. Auch Else Knake hat sich mit diesem Problem beschäftigt. Um die Verhältnisse möglichst einheitlich zu gestalten, wurde lediglich die Milz von Ratten zur Untersuchung herangezogen.

Die Versuchstiere, die ursprünglich in Vettern-Inzucht gelebt hatten, wurden als Bruder-Schwester-Inzucht weitergeführt. Die Transplantate zwischen Vettern verschiedenen Grades wurden nach 1–183 Tagen und diejenigen von Brüdern eines Wurfes nach 37, 113 und 211 Tagen histologisch untersucht. Es wurden genügend Versuche ausgeführt, um die Ergebnisse statistisch zu sichern. Transplantate zwischen Inzucht-Brüdern waren Autotransplantaten recht ähnlich, während diejenigen zwischen Inzucht-Vettern verschiedenen Grades homoplastischen Überpflanzungen ähnlicher waren. Es zeigte sich also übereinstimmend, daß zunehmende genetische Ähnlichkeit und stärkerer Verwandtschaftsgrad entscheidend für die Absterberate waren. Je näher verwandt die Tiere waren, um so länger lebten die Transplantate. Ein 211 Tage altes Transplantat zwischen Inzucht-Brüdern zeigte praktisch den gleichen Gewebsaufbau wie ein 342 Tage altes Autotransplantat. Erst bei sehr genauen histologischen Untersuchungen konnten allerfeinste Nekrosen und Gewebsunterschiede in den Homotransplantaten gefunden werden. Ein 78 Tage altes Transplantat zwischen nichtverwandten Ratten zeigte weitgehende Absterbeerscheinungen, die stärker fortgeschritten waren als die eines 72 Tage alten Transplantates zwischen Inzucht-Vettern. Das 118 Tage alte Transplantat zwischen Inzucht-Vettern ergab keine Milzstruktur mehr. Rote und weiße Pulpa waren nicht mehr erkennbar.

Medawar (zitiert nach Sherwood-Lawrence) hat gezeigt, daß die Überlebenszeit von Homotransplantaten umgekehrt proportional zur übertragenen Gewebsmenge liegt. Wenn die Hautquantität, die in Homotransplantaten auf ein Kaninchen übertragen wurde, auf $^1/_8$ der ursprünglichen Dosis reduziert wurde, stieg die Überlebenszeit des Transplantates auf das $1^1/_2$fache.

Die Verabreichung des antigen-haltigen Materials braucht aber nicht nur in Form eines Trans- oder Implantates zu erfolgen, sondern kann – wie beispielsweise bei der Zellulartherapie – auch als

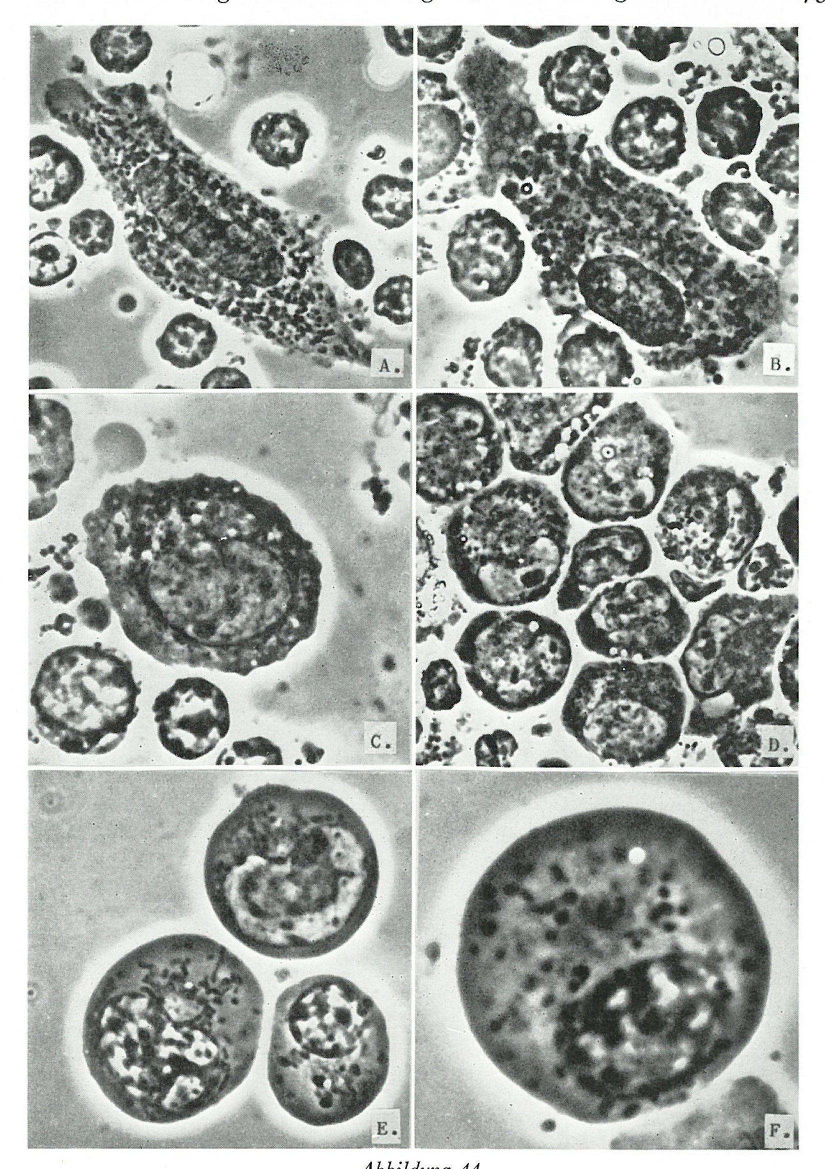


Abbildung 44
Differenzierung und Reifung von Plasmazellen aus dem Lymphknoten der Ratte (Phasenkontrast-Verfahren). A: Reticuloendothel-Zelle bei der Ablösung; B: Reticulum-Zelle. C: «Haemohistioblast». D: «Haemohistioblast» (unten rechts und unten Mitte); Makrophagen und Plasmoblast. E: Plasmoblast mit sichtbarer Centriole (oben); Proplasmazelle (links); kleine Plasmazelle (rechts). F: Reife Plasmazelle stark vergrößert.

(Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd. London 1960.)

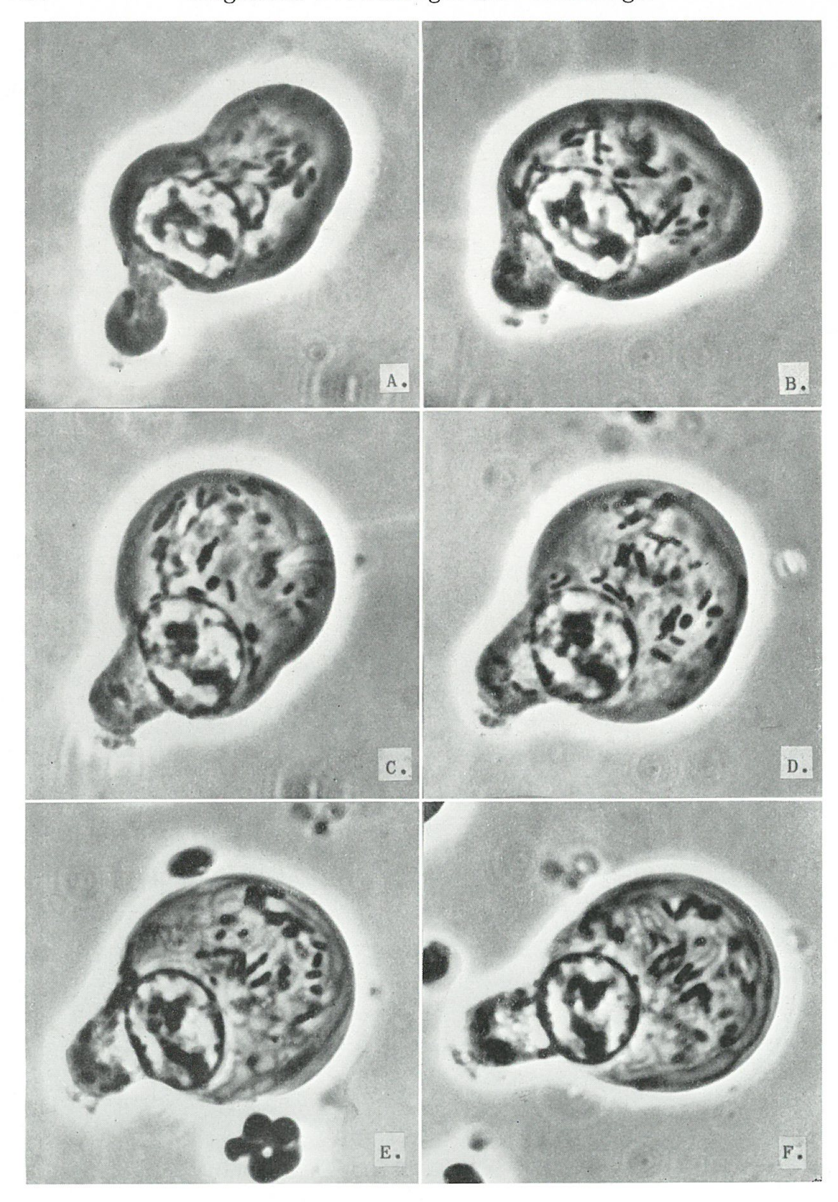


Abbildung 45

Bewegungen einer Plasmazelle aus Ratten-Lymphknoten in vivo (Phasenkontrast-Verfahren, Zeitabstand von wenigen Minuten); in Abbildung C wird das Ergastoplasma sichtbar.

(Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd., London 1960.)

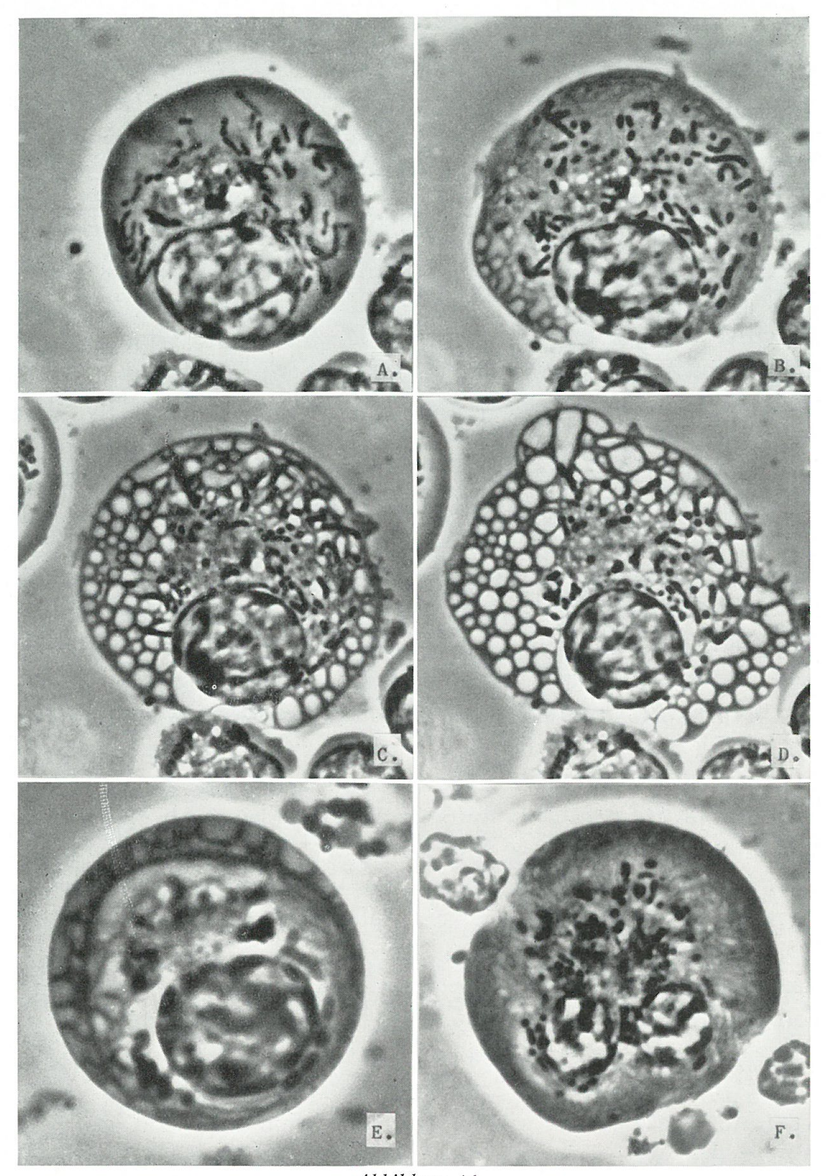


Abbildung 46
Lysis einer Plasmazelle aus Ratten-Lymphknoten (Phasenkontrast-Verfahren). A, B, C, D: Vier Aufnahmen derselben Zelle in Zeitintervallen von wenigen Minuten. Auftreten degenerativer Vacuolen im Ergastoplasma. E: Vacuolisierung der Peripherie des Cytoplasmas. F: Lysis einer doppelkernigen Plasmazelle.

(Aus: Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity, J. & A. Churchill Ltd., London 1960.)

intramuskuläre, subkutane oder intravenöse Injektion erfolgen. Bei Sensibilisierungsversuchen mit Leukocyten, die intradermal verabreicht waren, wurde ein 18mal stärkerer Gewebseffekt der allergischen Entzündung gefunden, als wenn die Leukocyten intravenös in gleicher Menge verabreicht wurden. Über den Grad der Sensibilisierung bei intramuskulärer Gabe des fremden Zellmaterials sind offenbar keine experimentellen, vergleichenden Untersuchungen angestellt worden.

Umstritten ist die Frage, ob es immunologisch völlig inaktive Zellen gibt, ob also Homotransplantate oder Injektionen von Gewebsbrei bestimmter Organe (zum Beispiel Ovarien und Nebennierenrinde) immunologisch völlig inaktiv sein können. Dies ist sehr unwahrscheinlich; aber es ist sicher, daß, unabhängig von der Einspritzungsart, die eine große Rolle spielt, die einzelnen Organgewebe sehr verschieden starke Antigen-Antikörper-Reaktionen auslösen. Brent hat darauf hingewiesen, daß Immunitätsvorgänge nur durch lebende Zellen zustande kommen können. Dem widerspricht aber, daß sich Antigen-Antikörper-Reaktionen auch durch Extrakte aus Zellen, durch DNS-Fraktionen und vor allem durch isolierte Eiweißsubstanzen erreichen lassen. Die Homotransplantationsreaktion ist individuell spezifisch. So ist es beispielsweise möglich, ein Tier gegen Hauttransplantate durch vorherige Injektion von Leukocyten, Leber-, Milz- oder Nierenzellsuspensionen zu sensibilisieren. Die Hauttransplantate sterben dann rasch ab (Medawar, Billingham und Brent, zit. bei Brent).

Ein Teil der Forscher hat sich bei Vornahme von Homotransplantationen um den Nachweis differenter Antikörper bemüht. Sherwood-Lawrence weist auf Arbeiten von Gorer hin, der verschiedene Antikörper finden konnte. Haemagglutinine wurden durch Amos nachgewiesen, neutralisierende Antikörper durch Gorer u. a, Grabar und Corvazier haben jüngst gezeigt, daß es möglich ist, in der Gewebskultur eine Produktion von Antikörpern zu erreichen, wenn der Anfang ihrer Bildung bereits in vivo eingesetzt hat. Auch gelingt der Nachweis von Agglutininen von Geweben, die einen Tag nach der Antigen-Injektion entnommen wurden. Die Ausbeute ist jedoch klein. Untersuchungen über die Zunahme des Milzgewichtes beim Hühnchen unter dem Einfluß eines antigenen Stimulans legen nahe, daß die Antikörperbildung nur dann mög-

lich ist, wenn die lymphatischen Organe im Wirtsorganismus hypertrophieren können.

Das Phänomen der Toleranz

Unter Toleranz versteht man die Fähigkeit eines Organismus, gegenüber eingebrachten fremden Gewebszellen immunologisch abgeschwächt oder überhaupt nicht zu reagieren. Ein Toleranzphänomen wird lediglich bei *homoplastischer* Übertragung beobachtet, niemals bei *heterologer* Überpflanzung. Es wird allgemein angenommen, daß die Antigenspezifität individualspezifisch ist. Wie aus den Transplantations-Experimenten zur Genetik hervorgeht, spielen die immunologischen Eigenschaften hinsichtlich der Art-Verwandtschaft zwischen zwei Individuen eine erhebliche Rolle. Das kann unter Umständen so weit gehen, daß ein fremdes, aber spezies-spezifisches Gewebe toleriert wird. Im englischen und amerikanischen Schrifttum sind zahlreiche experimentelle Untersuchungen zu diesem Problem beschrieben worden, in denen auf die Wichtigkeit seiner Klärung hingewiesen wird. Es wird beim Menschen nur dann gelingen, homoplastische Gewebe mit Erfolg zu übertragen, wenn die vielen Möglichkeiten, die das Toleranzphänomen bietet, ausgenutzt werden. Folgende Tatsachen ergeben sich dabei:

a) Das Phänomen der aktiv erworbenen Toleranz

Bei zweieiigen Zwillingen mit unterschiedlichen Blutgruppeneigenschaften kann im Mutterleibe ein diaplacentarer Austausch von Blutzellen stattfinden, auf Grund dessen jeder Zwilling tolerant wird gegen die Blut-Antigene des anderen. Die Toleranz bleibt auch postnatal erhalten (Blut-Chimären). Untersuchungen an Chimärenkatzen haben eine Verträglichkeit der einen gegenüber Hauttransplantaten der anderen über lange Zeiträume gezeigt. Die Spezifität des Phänomens erhellt aus der Tatsache, daß Hauttransplantate anderer Tiere der gleichen Spezies nicht vertragen werden.

b) Induktion einer Toleranz durch lebende Zellen

Billingham, Brent und Medawar injizierten homologe Zellaufschwemmungen erwachsener Tiere in Mäuse-, Hühnchen-, Kaninchen- oder Rattenembryonen (die Toleranz ist spezies-spezi-

fisch). Die so behandelten Versuchstiere tolerierten nach der Geburt Hauttransplantate jener Spender, von denen sie intrauterin gespritzt worden waren. Die eingebrachten fremden Antigene werden dem genetischen Muster des Empfängers eingefügt und werden damit sozusagen Bestandteile des anderen Organismus. Haut- oder Organüberpflanzungen des Spenders verhalten sich dann später wie Autotransplantate und lösen keine Immun-Reaktion mehr aus. Es konnte festgestellt werden, daß bei der Maus und dem Hühnchen die Zeit der Geburt hinsichtlich der immunologischen Antwort auf fremde Gewebsreize eine Übergangsperiode ist. Tiere, die mit homologen Zellen bei der Geburt inokuliert wurden, zeigten einen verschiedenen Toleranzgrad. Neugeborene Mäuse waren nur zu 10% tolerant im Vergleich zu 45% bei den fetalen Mäusen. Diese Übergangsphase wird als Null-Phase bezeichnet. Sie wechselt von Spezies zu Spezies und innerhalb einer Tierart von Individuum zu Individuum.

c) Toleranz gegenüber Tumoren

Gross (zit. bei Sherwood-Lawrence) konnte zeigen, daß Mäuse gegenüber leukämischen Tumoren eines anderen Mäusestammes resistent sind und sich verhalten, als ob sie als Embryonen mit diesen Zellen inoculiert worden wären.

Einige Beobachtungen sprechen dafür, daß die Zellkerne von Tumoren nicht die typischen Antigene enthalten, wie man sie sonst in lebenden Zellen findet. Es ist durchaus denkbar, daß in der Tumor-Zelle T- und H-Antigene chemisch verändert werden und dadurch ihre antigenen Qualitäten teilweise oder vollständig einbüßen.

d) Induktion der Toleranz mit anderen als Gewebsantigenen

Untersuchungen von Dixon und Maurer sprechen dafür, daß große Mengen von heterologen Plasmaproteinen (menschliches Plasma) oder Rinderserum-Albuminen den Immunitätsgrad bei späterer Transplantation wesentlich herabzusetzen vermögen. Doch geschieht das nie in solchem Ausmaß wie bei Inoculation von fremdem Zellmaterial in embryonale Tiere, das heißt, es werden niemals alle immunologischen Reaktionen durch eine solche Vorbehandlung unterbunden.

e) Vergrößerung des Tumorwachstums

In Beobachtungen von SNELL, GORER, KALIS und BRENT wurde festgestellt, daß manche Tumoren, die als Transplantate einem fremden Organismus eingepflanzt wurden, dann eine erstaunliche Toleranz gegenüber fremdem Gewebe auslösen, wenn sie selbst erheblich an Wachstum zunehmen. Das Phänomen ist noch nicht genügend geklärt und tritt auch nicht bei allen Tumorexperimenten in gleicher Weise auf.

f) Immunologische Paralyse

Von FELTON stammen Beobachtungen, daß mit kleinen Dosen von Pneumokokkensacchariden eine hinreichende Antikörperproduktion bei erwachsenen Mäusen erzeugt werden kann, die diese Tiere in die Lage versetzt, gegenüber vorgenommenen Homotransplantationen eine gewisse Toleranz zu zeigen.

g) Unspezifische Hemmung der Homotransplantatsensibilisierung

Unter den Substanzen, die eine geringe Toleranz bewirken können, stehen die Nebennierenrindenhormone (Cortison) und ACTH aus der Hypophyse an erster Stelle. Es ist allerdings nicht möglich, beliebig lange immunologische Erscheinungen zu unterdrücken. Die für den Effekt der Toleranz benötigten Dosen an Cortison liegen nach Untersuchungen von MEDAWAR außerordentlich hoch. Auch scheinen tragende Tiere das Phänomen einer gewissen Immunitätstoleranz aufzuweisen (MEDAWAR).

h) Röntgenbestrahlung

Durch Röntgenbestrahlung des ganzen Organismus kann vorübergehend der gesamte immunologische Apparat ausgeschaltet werden, was zu einer ganz erheblichen Verlängerung der Überlebenszeit und vollständigen Tolerierung von Haut-Homotransplantaten führt (BRENT). J. STEIN hat die historische Entwicklung dieser Art der Toleranz beschrieben. Er erwähnt dabei die von MATHÉ und SALMON 1959 beschriebenen Krankengeschichten von sechs Forschern, die einer Ganzbestrahlung mit Neutronen und Ga-Strahlen ausgesetzt waren und durch ausreichende Mengen menschlichen Knochenmarks gerettet werden konnten.

i) Halsted-Prinzip

Die Intensität der immunologischen Abwehr gegen ein Homo- oder Heterotransplantat ist weitgehend abhängig von dem «Bedarf», den der Empfänger für das überpflanzte Gewebe hat. HALSTED hat im Jahre 1909 – also schon in den Anfängen der Transplantationstherapie – auf Grund seiner Tierexperimente auf diese Abhängigkeit hingewiesen. Er überpflanzte homologe Nebenschilddrüse auf Hunde. Als Implantationsort wählte er die Muskulatur und die Milz. Die Implantate wurden nur dann toleriert, wenn er dem Empfänger-Hund vorher Teile der Nebenschilddrüse operativ entfernt und dadurch eine Unterfunktion geschaffen hatte. Die überpflanzten Nebenschilddrüsen übernahmen dann auch eine Funktion und kompensierten die Schädigung der eigenen Drüsen.

Die Gültigkeit des HALSTED-Prinzips ist später – und vor allen Dingen in der Zellulartherapie – immer wieder bestätigt worden. NIEHANS hat zum Beispiel einem Knaben, dem von Geburt an infolge einer Mißbildung das obere Drittel eines Femur und auch der Femurkopf fehlten, die entsprechenden Knochenteile von einem Tierfeten frisch überpflanzt und einen Erfolg beobachtet. Das Transplantat heilte – weil es eben benötigt wurde – reaktionslos ein und gab über Monate hin Stoffe an den Femur des Kindes ab, der sich dann voll ausbildete, während das Transplantat langsam resorbiert wurde.

FORD soll die Schilddrüsen von Mäusen experimentell geschädigt und ihnen dann Schilddrüsengewebe von Ratten implantiert haben. Das Implantat wurde angeblich toleriert und beteiligte sich am Wiederaufbau der geschädigten Drüse, wie durch Chromosomen-Differenzierung nachgewiesen wurde.

3. Trans- oder Implantation heterologer Gewebe

Über die heterologe Transplantation ist experimentell nur wenig gearbeitet worden, weil für dieses Problem bisher kein besonderes klinisches Interesse bestand. Nach dem bisher Gesagten ist es einleuchtend, daß ein Gewebe um so besser vertragen wird, je näher es dem des Empfängers verwandt ist. Es ist selbstverständlich, daß die Übertragung homologer Pfröpflinge mehr Aussicht auf Erfolg zur Einheilung hat und besser vertragen wird als die eines Hetero-

transplantates. Diese Frage ist experimentell von Heinz TIEDEMANN an der Ratte bearbeitet worden. Er verpflanzte Rattenhaut auto- und homoplastisch in subcutane Taschen. Außerdem wurden Mäusehaut und Meerschweinchenhaut heteroplastisch auf Ratten und Rattenhaut auf Mäuse nach der gleichen Methode übertragen. Nach Tuscheinjektionen wurden die Auto- und Homotransplantate nach 1–51 Tagen histologisch untersucht, während die Heterotransplantate bereits nach 5–20 Tagen kontrolliert wurden. Es kam bei den Autotransplantationen zu den bekannten Erscheinungen der unspezifischen Entzündung mit späterer Anheilung. Bis zu 14 Tagen ähnelten sich Auto- und Homotransplantate, dann begann die langsame Abstoßung des Homotransplantates. Im Gegensatz zu diesen beiden Arten der Gewebsübertragung verhielten sich Heterotransplantate, die in gleicher Schichtdicke übertragen wurden, vollständig anders. Bereits nach 5–9 Tagen waren Bindegewebe und Blutgefäße der Heterotransplantate vollständig zugrunde gegangen. Nur einzelne Epithelzellen waren erhalten. Heterotransplantate der Maus auf die Ratte sind bereits nach 14 Tagen durch Granulationsgewebe ersetzt. Der Reaktionsablauf beim Absterben verläuft stürmischer, schneller und ähnelt daher in manchem eher dem Arthustyp, mit teilweiser Verquellung des Pfröpflings. Die Verödung der Gefäße beginnt schneller und intensiver, so daß die Blutversorgung des Transplantates schon nach wenigen Tagen vollständig abgeschnitten ist. Ein Toleranzphänomen gibt es bei heterologen Transplantaten nicht. Es ist demnach auch nicht möglich, durch Vorbehandlung mit Röntgenstrahlen oder durch Gabe von Cortison, ACTH oder andere Maßnahmen ein teilweises Angehen von heterologen Transplantaten zu erreichen, wie das bei homologen Pfröpflingen der Fall ist.

Man muß sich klarmachen, daß bei der Zellulartherapie ausschließlich mit heteroplastischem Gewebe gearbeitet wird. Vielfach gelangen fetale Zellen zur Verwendung, in anderen Fällen aber werden Gewebe erwachsener Tiere gebraucht. Faßt man die bisherigen Ergebnisse der auto-, homo- und heterologen Transplantation von Geweben zusammen, so sind es vier Faktoren, die für Angehen oder Absterben von Transplantaten ins Gewicht fallen.

1. Ein Gewebe überlebt, wenn es einen endgültigen Gefäßanschluß zum Wirtsgewebe bekommt, der die Durchblutung und

damit die Ernährung seiner Zellen sichert. Für das Überleben eines Transplantates ist also die Herstellung eines Blutkreislaufes und eines Lymphstromes zwischen Transplantat und Wirt notwendig.

2. Durch den Lymphstrom gelangen die Antigene in den Wirtsorganismus, wo sie in den Lymphknoten, der Milz und den RES-Zellen der Leber die Bildung der Antikörper auslösen. Die Entwicklung eines Blutkreislaufes zwischen Wirt und Transplantat und eines Lymphabflusses ist also auch Voraussetzung für Immun-Reaktionen. Sie spielen sich in den allerersten Tagen ab. Man weiß, daß die Vergrößerung von Milz und Lymphknoten am zweiten Tage nach Zufuhr der antigenen Substanzen am größten ist. Das Schicksal von autologen und homologen Transplantaten verläuft über etwa 6–8 Tage gleich. Dann sind genügend Antikörper gebildet worden, die das Absterben des homologen Pfröpflings und Thrombosierung durch Untergang der Gefäße sowie Nekrobiose einleiten.

3. Je enger die Verwandtschaft von Transplantat und Wirtsgewebe, um so länger wird der Pfröpfling toleriert. Es läßt sich gewissermaßen aus der Länge der Überlebenszeit der Grad der Verwandtschaft ableiten. Zur Unterscheidung können feinste histologische Unterschiede im Vergleich zu autoplastischen Transplantaten herangezogen werden. Genetisch identische Zwillinge können ihre Gewebe beliebig austauschen, wie durch Parabiose-Versuche nachgewiesen wurde. Zwei verschiedene antigene Substanzen kommen in Frage: die T-Antigene (Transplantationsantigene) und die H-Antigene (humorale Antigene). T-Antigene stammen aus den Kernfraktionen der übertragenen Zellen. Sie sind vielleicht mit DNS-Substanzen identisch. Es ist möglich, daß die antigene Eigenschaft an das Vorhandensein von Polysaccharidsubstanzen gebunden ist. Nicht sicher ist es, ob die H-Antigene ebenfalls den Kernsubstanzen angehören oder aus Mitochondrien oder Mikrosomen stammen, die Antigenqualität aufweisen. Es muß angenommen werden, daß neben diesen beiden noch andere unspezifische Antigene eine Rolle spielen (Eiweißsubstanzen, Zerfallprodukte usw.).

4. Das Schicksal überpflanzter Gewebe hängt, außer von den erwähnten Faktoren, auch weitgehend davon ab, ob der Wirtsorganismus einen Bedarf für das Transplantat hat. Wenn Homo- oder Heterotransplantate vom Empfänger benötigt werden, um eine gestörte Funktion wiederherzustellen, so toleriert der Organismus derartige Gewebe oder Zellen und bleibt immunologisch stumm. Diese von HALSTED gewonnene Erkenntnis hat sich in der Praxis der NIEHANSschen Zellulartherapie in vielen tausend Fällen als richtig erwiesen. Über die biologigische Grundlage des HALSTED-Prinzips wissen wir allerdings noch nichts Sicheres.

NIEHANS weist auf Grund seiner eigenen umfangreichen Erfahrungen darauf hin, daß neben dem «Bedarf» des Empfängers – der die Indikation zu seiner Therapie maßgeblich bestimmen sollte – auch die kunstgerechte Implantation ohne Zeitverlust für den Erfolg ausschlaggebend ist.

III. Die Variationsmöglichkeiten der Überpflanzung

a) Die Übertragung embryonaler Zellen oder Gewebe in den embryonalen Organismus

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß Antigene in embryonalen, fetalen und adulten Geweben vorhanden sind. Wir wissen wenig darüber, wann antigene Substanzen im Leben eines Organismus gebildet werden. Die Klärung dieser Frage ist schwierig, weil es wahrscheinlich in der Zelle und erst recht in Gewebsaufschwemmungen eine Fülle von Antigenen gibt, über deren Lokalisation und Chemismus wir nichts Genaues wissen. Die Untersuchungen von MEDAWAR und seiner Schule haben gezeigt, daß T-Antigene bereits sehr früh in der Embryonalperiode nachweisbar sind und damit auch wirksam werden können.

Die Injektion embryonaler Zellaufschwemmungen in einen fremden Organismus löst möglicherweise Antigen-Antikörper-Reaktionen aus. Da wir aber nicht wissen, inwieweit diese Antigene klinisch faßbare Erscheinungen bewirken können, ist es müßig zu diskutieren, ob durch Gabe embryonaler Zellgewebe ernste klinische Zwischenfälle verursacht werden können. Wenn sie überhaupt bei

der NIEHANSschen Zellulartherapie vorkommen, sind sie nach Gabe embryonaler Zellaufschwemmungen geringer als nach Injektion adulter Gewebsteile.

Embryonale Zellen lösen – wie experimentell genügend untermauert wurde – im erwachsenen Organismus Antigen-Antikörper-Reaktionen aus, hingegen ist der Embryo selbst noch zu keiner immunologischen Antwort fähig. Auf Injektion fremder Gewebszellen bleibt er stumm (Toleranzphänomen).

Viele Forscher haben ihre Experimente mit embryonalen oder erwachsenen Zellen an Embryonen oder adulten Tieren einzig und allein auf die Beeinflussung des Wachstums ausgerichtet. Sie hofften, durch Gabe von Nierenzellen ein ausschließliches Wachstum der Niere herbeizuführen. Diese Versuche sind ohne eindeutige Ergebnisse geblieben. EBERT konnte allerdings nachweisen, daß mit spezifischen Immunseren, zum Beispiel von Niere, ein Wachstum der Niere im embryonalen Organismus angeregt wurde. Doch war die Wachstumszunahme auch in den besten Versuchsergebnissen immer sehr gering. In Nachuntersuchungen konnten die Ergebnisse von EBERT (zit. nach RIETSCHEL) nicht bestätigt werden. Alle Versuche mit der Trans- oder Implantation sollten vorwiegend

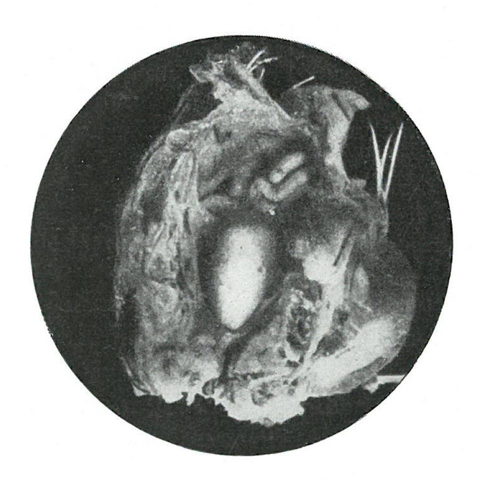


Abbildung 47
Milz des Hühnchenembryos nach 17 Tagen. Man beachte die außerordentliche Größenzunahme der Milz. (Aus Danchakoff in Amer. J. Anat. 1916.)

unter dem Gesichtspunkt immunologischer Reaktionen gesehen und gedeutet werden.

Von dieser Warte aus werden auch Ergebnisse älterer Befunde von MURPHY und Vera DANCHAKOFF aus dem Jahre 1916 (zit. bei RIETSCHEL) besser verständlich. Sie transplantierten homologes Gewebe der Milz, des Knochenmarks, der Leber oder der Niere erwachsener Tiere auf die Allantois des bebrüteten Hühnereies. Es kam zu einer geringen Wachstumszunahme des jeweiligen Implantates selbst. In allen Fällen entwickelte sich aber eine riesige Vergrößerung der Milz des Hühnchenembryos auf das Zehnfache. Die übrigen Organe blieben unter dem Reiz des Implantates kleiner als normal. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß eine spezifische Wachstumsanregung einzelner Organe wohl nicht stattfindet. Es treten immunologische Reaktionen auf, die in dieser Versuchsanordnung den Charakter des «Runt disease» tragen, weil der Empfängerorganismus immunologisch noch zu keiner Antwort fähig ist. Für diese These spricht gerade die Vergrößerung der Milz und das Zurückbleiben aller anderen Organe im Wachstum (Kümmerwuchskrankheit, Abbildung 47).

Diese Untersuchungen von MURPHY und DANCHAKOFF wurden von ARGENTON, WAGNER und H. FISCHER ebenfalls unter der Fragestellung einer spezifischen Wachstumsbeeinflussung wiederholt. Die genannten Autoren verwendeten als Transplantate nicht Gewebsstücke erwachsener, sondern embryonaler Spender. So wurde beispielsweise ein kleines Implantat einer sechs Tage alten embryonalen Hühnchenleber auf die Allantois des Hühnereies eingepflanzt, das Ei mit Paraffin geschlossen und mehrere Tage weiter bebrütet. Als dann das Ei später geöffnet wurde, fand sich keine Größenzunahme der Leber oder der Milz. Spezifische Wachstumseinflüsse waren demnach ebenso ausgeblieben wie Antigen-Antikörper-Reaktionen in einem immunologisch noch stummen Empfängerorganismus. Auch NEUMANN hat diese Experimente unter dem Gesichtspunkt einer spezifischen Wachstumsanregung durchgeführt. Bei Implantation von embryonalem Lebergewebe kam es nicht zu einer Vergrößerung der Milz oder Niere. Dagegen führte das Aufbringen von Nierengewebe auf die Allantois des Hühnereies zu einer durchschnittlichen Größenzunahme der Niere um das 1½fache gegenüber Kontrolltieren.

b) Die Übertragung embryonaler Zellen oder Gewebe in den fetalen Organismus

Während der embryonale Organismus immunologisch auf antigene Reize noch nicht zu antworten vermag, reagiert der reife Säugetierorganismus mit mehr oder minder ausgeprägten Antikörperreaktionen, die in ihrer Stärke von Menge und Qualität des Antigens und den besonderen immunologischen Eigenschaften des Empfängers abhängen. Die Embryonalphase und das Reifestadium eines Organismus sind sozusagen die beiden Extreme mit der fehlenden und der maximalen immunologischen Antwort. Zwischen diesen beiden Polen liegt die Fetalperiode, in der die immunologische Reaktionsfähigkeit entweder gerade schon vorhanden ist oder kurz vor der Entwicklung steht. Die Fetalzeit heißt deshalb auch die Nullperiode. Die Reifung zur immunologischen Antwort erfolgt bei einigen Tieren kurz vor der Geburt, bei anderen etwa mit dem Geburtsvorgang, bei wieder anderen erst einige Zeit danach. Sie wechselt nicht nur von Spezies zu Spezies, sondern ist auch beim einzelnen Individuum verschieden. Nach Untersuchungen von Woodruff und Simpson (zit. nach Sherwood-Lawrence) zeigt die neugeborene Ratte eine Toleranz, die bis zum 14. Tage nach der Geburt anhält. Erst danach wird die Fähigkeit entwickelt, auf antigene Reize mit der Bildung von Antikörpern zu reagieren. Dabei interessiert die Frage, ob die Toleranzfähigkeit schnell verloren geht, und der Organismus die Befähigung zur Immun-Reaktion innerhalb weniger Tage erlangt – oder ob der Toleranzverlust und die Entwicklung der Immunbereitschaft allmählich über einen längeren Zeitraum erfolgen.

Billingham, Brent und Medawar führten Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies durch. Mit Zellen von erwachsenen oder fetalen Geweben (Blut, isolierte Leukocyten, Milzzellen, Niere, Leber oder Testis) erzeugten sie bei CBA-Mäuseembryonen am sechsten oder am siebzehnten Tage des fetalen Lebens eine Toleranz. Sechs oder acht Wochen nach der Geburt erhielten die Mäuschen Haut-Homotransplantate von Individuen, die dem Spender der toleranz-induzierenden Gewebe isogenetisch verwandt waren. Eine tatsächliche Toleranz bestand nur dann, wenn Organzellen von Leber, Niere zur Induktion verwendet worden waren. Die Vorbe-

handlung mit Blutzellen oder konzentrierten Leukocyten hatte in den Feten keine vollständige Toleranz auszulösen vermocht. War die Injektion des Feten zur Toleranzinduktion am achtzehnten Tage vor der Geburt erfolgt, so war sie weit wirksamer als achtzehn Tage nach der Geburt. Bei den ersten Versuchen hielt die Toleranz etwa 50/110 Tage an, in Ausnahmen sogar 200/450 Tage. Bei Vorbehandlung der jungen Tiere achtzehn Tage nach der Geburt hielt die Toleranz hingegen nur kurze Zeit an. Die Immunreaktionen waren dann aber geringer als beim gewöhnlichen Transplantationsversuch mit erwachsenen Tieren ohne Toleranz.

Ähnliche Resultate ergaben sich, wenn zehn bis elf Tage alte Hühnchenembryonen von Leghornhühnern intravenös mit Blutzellen inoculiert wurden oder man auf ihre Allantoismembran Stückchen von Niere, Milz, Herz oder Lunge aufpflanzte und später Hautüberpflanzungen folgten. Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurde eine erworbene Toleranz bei Kaninchen und Ratten erreicht.

Tierversuche an der Ratte und der Maus ergaben, daß der Verlust der immunologischen Toleranz allmählich abläuft und daß die Fähigkeit zu Antigen-Antikörper-Reaktionen sich innerhalb von Wochen entwickelt. Das ist beim menschlichen Organismus sicher anders. Wissen wir doch vom Säugling, daß sich seine immunologischen Qualitäten erst langsam ausbilden. Das Ausbleiben bestimmter Infektionserkrankungen im ersten Lebensjahr hat man früher mit dem Vorhandensein mütterlicher spezifischer Antikörper erklären wollen. Es muß jedoch die Frage gestellt werden, ob hier die Fähigkeit zur immunologischen Antwort auf antigene Reize noch fehlt, weil möglicherweise die Reifung des lymphatischen Apparates noch unvollkommen ist. Auch könnte hier der Thymus und seine spätere Rückbildung eine Rolle spielen.

c) Die Übertragung embryonaler Zellen in den adulten Organismus

Eingehende Untersuchungen zur Übertragung embryonaler Zellen wurden von Haskova durchgeführt. Embryonen eines schwarzen Mäusestammes C-57 im Alter von acht, zehn und zwölf Tagen wurden in Teile zerschnitten und unter sterilen Bedingungen unter die Rückenhaut erwachsener Mäuse eines Inzuchtstammes implantiert. Das Überleben der embryonalen Pfröpflinge wurde makro-

skopisch und histologisch zwanzig Tage lang überwacht. Die bei dieser Versuchsanordnung auftretenden Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden genau untersucht, unter anderem mit dem Transplantationstest nach BILLINGHAM. Vier oder fünf Tage nach der Injektion der embryonalen Zellen wurde Haut vom Rücken der adulten Mäuse an andere Stellen der Maus transplantiert. Diese Transplantate wurden zu einem Zeitpunkt histologisch untersucht, an dem autologe Transplantate bereits keine histologischen Veränderungen mehr aufzuweisen pflegen. Die histologische Prüfung zeigte, daß eine Zerstörung der embryonalen Pfröpflinge begleitet war von denselben lokalen Reaktionen wie beim Untergang erwachsener Hauttransplantate. Durch diese Untersuchungen scheint es bewiesen, daß wenigstens bei der Maus schon sehr frühzeitig die embryonalen Gewebs-Antigene vorhanden sind, die zu immunologischen Reaktionen im adulten Organismus führen. Diese Tatsache wird auch von MEDAWAR betont, der in eigenen experimentellen Untersuchungen zu gleichen Schlußfolgerungen gekommen ist. MEDAWAR meint, daß mindestens die T-Antigene vor der Geburt gebildet werden. BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR zeigten, daß die Injektionen von 1½ Tage alten embryonalen Mäusegeweben in erwachsene Mäuse eines anderen Stammes innerhalb von sechs Tagen zu einem Untergang von Hauttransplantaten führt, die drei Tage später übertragen wurden. MEDAWAR betont mit Recht, daß die einzige befriedigende Methode, um die Antigenqualität embryonaler Gewebe zu testen, ihre Fähigkeit sei, Toleranz-Phänomene hervorzurufen. Dabei werden embryonale Zellen sehr kurz vor dem Ende der «adaptiven Periode» ihrer Wirtsgewebe injiziert. Es gelang auf diese Weise nachzuweisen, daß T-Antigene in sechs Tage alten Hühnchenembryonen bereits vorhanden sind (TERASAKI und MEDAWAR), ebenso in elf Tage alten Mäuseembryonen.

Embryonale Gewebe enthalten also bereits hochwirksame Antigene, die bei der Injektion in den embryonalen Organismus zur Toleranz führen, dagegen bei Einverleibung in den erwachsenen Körper gleiche oder ähnliche immunologische Reaktionen hervorrufen, wie bei der Übertragung homologer oder heterologer Gewebstransplantate oder auch Gewebsfragmente (Zellulartherapie) adulter Tiere.

d) Die Übertragung fetaler Zellen oder Gewebe

Für die Auslösung immunologischer Reaktionen ist nicht die Art der verabreichten Zellen (embryonal, fetal, adult), sondern das Entwicklungsstadium des Empfänger-Organismus maßgebend. Im embryonalen Zustand werden speziesgleiche fremde Gewebe und Zellen vertragen, im erwachsenen Stadium nicht mehr. Es erhebt sich die Frage, ob injizierte fetale Gewebsaufschwemmungen schwächere Antigen-Antikörper-Reaktionen auslösen als solche adulter Herkunft. Es ist noch einmal zu betonen, daß ein Toleranzphänomen nur unter speziesgleichen Versuchstieren auszulösen ist. Werden also Mäuseembryonen eines Stammes während der Embryonalzeit mit Zellen erwachsener Mäuse eines anderen Stammes injiziert, so entsteht Toleranz. Das gleiche Experiment mißlingt aber, wenn den Mäuseembryonen Rattenzellen inoculiert werden. Zwar sind die vorbehandelten Mäuseembryonen immunologisch noch stumm, doch werden spätere Transplantate von Rattenhaut von den inzwischen erwachsenen Mäusen genauso abgestoßen wie ohne Vorbehandlung.

In der NIEHANSschen Zellulartherapie werden heterologe Gewebselemente verwendet. Es kann deshalb nicht erwartet werden – wenn man kranken Menschen tierische Zellen injiziert –, daß man das Toleranzphänomen ausnützen könnte. Auch ist es nicht wahrscheinlich, daß die Injektion fetaler Zellen dem menschlichen Organismus immunologische Reaktionen gänzlich ersparen würde. Es ist möglich, aber nicht sicher bewiesen, daß schädliche Antigen-Antikörper-Reaktionen bei Verwendung fetalen Gewebsmaterials quantitativ geringer ausfallen als bei Gabe adulter Zellen. Doch scheint es sicher zu sein, daß die Antigenqualitäten einzelner Organgewebe verschieden sind und daß manche Gewebe ihren vollen Antigengehalt erst mit Beendigung der Reifung erlangen.

e) Übertragung adulter Zellen oder Gewebe in den embryonalen Organismus

Die Injektion homologer adulter Zellen in den embryonalen Organismus erzeugt eine Toleranz. Von besonderer Bedeutung sind neuere Untersuchungen von BILLINGHAM, der Milzzellen in einer Menge von 5–10 Millionen – die in Ringerlösung suspendiert waren und von erwachsenen Mäusen stammten – neugeborenen Mäu-

sen intravenös injizierte. Die Spendermäuse gehörten einem CBA-Stamm an. Von diesen Mäusen wurden fünf bis acht Wochen später kleine Hautstücke transplantiert auf die inzwischen älter gewordenen Mäuse, die die Milzzellen empfangen hatten. Die Fähigkeit der Toleranz verminderte sich mit der Zunahme des Alters der Empfängermäuse zur Zeit der ersten Injektion. Empfängermäuse, die ihre erste Injektion von Milzzellen vier Tage vor der Geburt erhalten hatten, erwiesen sich noch als tolerant. Vier Tage nach der Geburt befanden sich die Mäuse dagegen in der sogenannten neutralen Periode. Ihre Reaktion auf spätere Hautüberpflanzungen von CBA-Spendermäusen ergab weder Toleranz noch Immunreaktion. Sie verhielten sich so, als hätten sie niemals eine Vorinjektion erhalten. Sieben Tage nach der Geburt mit Milzzellen gespritzte Mäuse zeigten dagegen alle charakteristischen Zeichen der Antigen-Antikörper-Reaktion bei der späteren Hautübertragung.

Es ist notwendig, in diesem Zusammenhang die schon mehrfach erwähnten Experimente von Medawar zur Erzeugung einer dauernden Toleranz ausführlicher darzulegen. Die Injektion embryonaler oder adulter Gewebszellen von Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Hühnchen in homologe Embryonen kann zu einer bleibenden Toleranz gegenüber den Antigenen der verwendeten Spender führen. Die Grundexperimente wurden von Medawar in der Weise ausgeführt, daß sechs Wochen nach der Geburt die in der Embryonalperiode gespritzten Tiere Hauttransplantate ihrer Spender erhielten. Dabei wurde Toleranz nicht in jedem Falle erreicht. Es konnte vorkommen, daß die Hauttransplantate neun bis elf Tage später in ähnlicher Weise abgestoßen wurden wie bei nicht vorbehandelten Tieren. In anderen Fällen wiederum ließ sich nur eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Hauttransplantate nachweisen. In manchen Fällen war die Toleranz unbegrenzt. Medawar erwähnt auf Grund der Arbeiten von Krohn, daß bereits bei Neugeborenen und auch beim Embryo mindestens 15 verschiedene Antigene nachzuweisen sind, die immunologische Reaktionen im Empfängerorganismus hervorrufen können. Es ist vorstellbar, daß eine Toleranz gegenüber einigen dieser Antigene durch Injektion adulter Zellen in dem Embryo hervorgerufen werden kann, während sie gegenüber anderen ausbleibt. Es wird notwendig sein zu versuchen, die Einzelantigene aus Geweben zu isolieren und

auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, ein Toleranzphänomen auszulösen. Ähnliche Experimente wie mit ganzen Zellen oder Zellgeweben sind mit Kernfragmenten durchgeführt worden. Es gelang auch, damit Toleranz zu erzeugen (Medawar).

f) Die Übertragung adulter Zellen oder Gewebe in den erwachsenen Organismus

Die Überpflanzung adulter Gewebe in den erwachsenen Organismus kann zu Unverträglichkeit führen. Dieser Mechanismus stellt sozusagen das extremste Beispiel immunologischer Reaktionen dar. Ein Toleranzphänomen bei der Übertragung adulter Gewebe oder Zellen in einen erwachsenen Organismus ist unbekannt. Selbst die radiologische Vorbehandlung eines Organismus schützt den übertragenen Pfröpfling nicht vor dem Untergang.

Eine Ausnahme dieser Regel bildet die heterologe Überpflanzung bestimmter Tumorgewebe auf andere Tiere. Putnoky (zit. bei E. Knake) gelang es, das bekannte *Ehrlich*-Carcinom der Maus jahrelang heterolog auf Ratten zu verimpfen. Bei der Besprechung des Toleranzphänomens von Homotransplantaten wurde bereits darauf hingewiesen, daß Impftumoren sich unter bestimmten Bedingungen am Leben erhalten können. Else Knake nimmt an, daß dieses Überleben mit der Bildung von Kapillarsprossungen im Transplantatbett zusammenhängen könne. Viel näher liegt aber die Erklärung, daß bösartige Tumoren durch die anaerobe Glykolyse befähigt sind, in einem Wirtsorganismus zu wachsen. Sie umgeben sich mit einem Säuremantel und werden damit gewissermaßen von der Umgebung unabhängig. Eine andere Möglichkeit, an die gedacht werden muß, könnte mit einer Abwandlung der verschiedenen Antigene im Tumor zusammenhängen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß bei der cancerösen Umbildung von Zellbestandteilen unter anderem die Kernsubstanzen grundlegende strukturelle und chemische Wandlungen (Änderungen der DNS) erfahren, bei der sie ihre natürlichen Antigenqualitäten verlieren. An und für sich sollte ein Säugetierorganismus bei einer grundlegenden Umformung seiner Kernbestandteile immunologisch reagieren, also eine Autoantikörperbildung herbeiführen, die ihrerseits ein von dem Krebsgeschehen unabhängiges Krankheitsbild auslösen müßte.

Der normale Organismus scheint jedoch solche krebsig entartete Gewebe nicht als Fremdantigene zu empfinden; daher bleibt er immunologisch stumm.

Die bei Zellulartherapie in Betracht kommenden immunologischen Reaktionen

VON PROF. DR. HANS SCHMIDT, BERN

Im Verhältnis zu dem heutigen Umfang der Zellulartherapie ist die Zahl der im Schrifttum berichteten Fälle von sofortigen Schocksymptomen und späteren lokalen und allgemeinen Reaktionen auffallend klein. Mit anderen Worten: die Injektion von für den Menschen artfremden Zellen wird in der Regel überraschend gut vertragen. Die erwarteten Reaktionen anaphylaktischer und allergischer Natur bleiben aus oder sind so geringfügig, daß sie einer weiteren Anwendung der Zellulartherapie nicht im Wege stehen (CASTENS 1957).

Es unterliegt keinem Zweifel, daß der menschliche Organismus auf die Implantation von artfremden Zellen in gesetzmäßiger Weise im Sinne der Allergologie reagiert, und doch hat die Erfahrung die relativ gute Verträglichkeit solcher Zellinjektionen erwiesen. Zur Begründung dieses anscheinenden Widerspruches sind folgende, kausal miteinander verflochtenen Gegebenheiten anzuführen:

1. die qualitativen antigenen Eigenschaften des injizierten Materials;
2. das Injektionsverfahren bezüglich Ort der Injektion, Menge und Verschiedenheit der Zellen in bezug auf Organ- und Artspezifität sowie das Intervall bei wiederholter Injektion;
3. die Natur und Reaktionsart der vom Empfänger gebildeten Antikörper.

Das dem noch lebenswarmen Tierkörper entnommene Organgewebe wird mechanisch zerkleinert, mit Ringerlösung aufgeschwemmt und durchgesiebt, um größere, die Injektionsnadel verstopfende Partikel auszuschließen. Diese Gewebezellsuspension ist sofort injizierbar: Frischzellmethode der Zellulartherapie nach NIEHANS. Oder aber das Gewebe wird sofort nach der Gewinnung aus dem Tierkörper einer Tiefkühlung mit anschließender lyophiler Vacuum-Trocknung unterzogen: Trockenzellmethode der Zellulartherapie. Es wäre aber falsch, Frischzellen von Trockenzellen im Sinne von «lebend» oder «tot» zu unterscheiden.

K. F. Bauer (1956) bezeichnet als Frischzelltherapie die Zufuhr lebendiger Substanz, die Behandlung kranken Lebens durch Zufuhr gesunden Lebens. «Frischzelle» ist nicht durch Begriffe wie Eiweiß oder Eiweißabbauprodukte zu kennzeichnen, denn lebendiges Protoplasma ist nicht einfach Eiweiß. Der Ausdruck Frischzellen soll lediglich das vitale Moment in den Zellen zum Ausdruck bringen. Unterkühlung unter mehr als —80° C und anschließende Sublimation im Hochvacuum ist kein Mittel der vitalen Konservierung (K. F. Bauer). Und doch erlauben Tiefkühlung und Wasserentzug durch Sublimation im Vacuum (bis zu einem Minimum an Restfeuchtigkeit) – also das Verfahren der lyophilen Trocknung sowie die Konservierung unterkühlter Zellen in Glycerin (zum Beispiel Erythrocyten, Spermatozoen) – für Jahre Zellen lebensfähig zu erhalten (A. U. Smith 1961).

Ein lebender (warmblütiger) Organismus ist ein wesentlich komplizierteres Gebilde als eine daraus isolierte lebende Zelle. Gewiß ist auch eine lebende Zelle mehr als das in ihr befindliche Eiweiß, aber für jedes biologisch aktive Eiweiß gilt – wie weiter unten erwähnt – daß dessen individuelles Gefüge in biologisch antigener Hinsicht so stabil ist, daß es den meisten Denaturierungsverfahren widersteht. Wenn die lyophile Trocknung lebender Organzellen auch nicht ohne eine gewisse Eiweißdenaturierung möglich ist, so bleibt die antigene Potenz und – wie die therapeutischen Erfolge mit Trockenzellen erweisen – auch die den Frischzellen zugeschriebene therapeutische Potenz erhalten.

Die zur Trocknung bestimmten Organgewebe-Zellen werden mit Ringerlösung gewaschen, und der abzentrifugierte Zellbrei wird lyophil getrocknet. Nach Siebung wird die Trockensubstanz unter Vacuum in Mengen von 25 mg bis 150 mg (je nach Organart) in einer isotonischen Lösung suspendiert, die selbst keinen N-haltigen Zusatz enthält. Aber die darin suspendierten Zellen lassen N-haltige Stoffe in Lösung gehen. Man darf annehmen, daß diese N-haltige Lösung antigene Stoffe enthält. Frischzellenbrei in injektionsfertiger Form enthält ebenfalls – neben den zelligen Gewebselementen – in Lösung gegangenes antigenes Material. Es wird also bei *jeder* Zellinjektion gelöstes antigenes Material mitinjiziert. Aber um wieviel Antigen, auf Eiweiß umgerechnet, handelt es sich?

Nach H. Dahmen werden bei 37° in 2 Minuten aus 100 mg Trok-

kenzellen durch 5 ml N-freie Flüssigkeit insgesamt 3,25 mg N (= 0,65 mg N/ml) gelöst. Anstatt allen Stickstoff in dieser Lösung als Antigen zu betrachten, sollen nur etwa 77%, also hier nur 2,5 mg Stickstoff, als Antigen gelten. Bei Umrechnung auf Eiweiß (1 g N = 6,2 g Eiweiß) erhält man 15,5 mg Eiweiß, die 100 mg Trockenzellen entsprechen.

Extrahiert man eine 100 mg Trockenzellen entsprechende Menge Frischzellen bei 37° für 1 Stunde mit 5 ml Ringerlösung, dann ergibt die Lösung

aus 514 mg Leber	6,50 mg N/5 ml
aus 584 mg Placenta	5,65 mg N/5 ml
aus 1098 mg Gewebe	12,15 mg N10/ ml

Werden davon nur 77% als Antigen angenommen, also nur 9,35 mg N (entsprechend 58 mg Eiweiß), so enthält etwa 1 g frische Gewebezellsuspension 58 mg lösliches Eiweiß.

Vergleicht man damit die bei der Tetanusserumprophylaxe gegebene Injektion von 3000 AE in 2 ml eines 1500fachen Serums mit 10% Eiweißgehalt, so enthalten diese 2 ml Serum 200 mg Eiweiß.

Um mit Frischzellen eine gleiche Eiweißmenge zu injizieren, braucht man etwa 3,45 g Frischzellen. Bei Trockenzellen enthalten 13 Ampullen mit je 100 mg etwa 200 mg lösliches Eiweiß.

Wie dieser Vergleich zeigt, sind die Mengen von gelöstem Antigen-Eiweiß bei der Zellulartherapie kleiner als bei den prophylaktischen und therapeutischen Seruminjektionen.

Dazu kommt noch der sehr wesentliche Unterschied, daß bei der Zellulartherapie nicht intravenös injiziert wird (wo dies geschah, traten auch gelegentlich Symptome anaphylaktischer Reaktionen auf), sondern intramuskulär. Hingegen wird bei Seruminjektionen – besonders wenn sie der Therapie dienen – vielfach i. v. injiziert, mit der Absicht, die Serumantikörper – und damit allerdings auch das antigene Fremdeiweiß – möglichst in die Blutzirkulation zu bringen.

Hier ist ein weiterer und sehr wesentlicher Umstand zu berücksichtigen, der die Antikörperbildung des Patienten nach Zellulartherapie betrifft.

Die Allergieforschung der letzten Jahre hat gezeigt, daß man passive Übertragung der Allergie durch zirkulierende Serumanti-

körper unterscheiden muß von der nur durch Zellen bedingten und übertragbaren Fähigkeit der Haut, auf intracutane Injektion des Antigens im verzögerten Sinne lokal zu reagieren. Gelangt gelöstes Protein in die Lymph- und Blutzirkulation, so sind in erster Linie sogenannte Plasmazellen (lymphocytären oder reticulären Ursprungs) in Lymphdrüsen und Milz an der Bildung von Antikörpern beteiligt. Diese Antikörper sind im Blut als Globuline nachweisbar und im klinischen Sinne für die Symptome der allgemeinen anaphylaktischen Reaktionen der Serumkrankheit, wie auch der lokalen Arthusreaktion, verantwortlich. Daneben kennt man seit den Arbeiten von LANDSTEINER und CHASE (1940) mit Pikrylchlorid eine verzögerte Hautreaktion, die passiv nur durch Zellen übertragbar ist und bei der Antikörper im Blut nicht nachweisbar sind. Nach B. BENACERRAF und F. G. H. GELL (1959) bewirkt eine einzige Injektion (in Meerschweinchenpfote) von konjugiertem Pikrylserumalbumin Antikörper gegen das haptene Pikryl (Arthusreaktion) und Hautallergie vom verzögerten Typ gegen den antigenen Eiweißträger. Die Konjugierung beeinträchtigt in denaturierender Weise die Spezifitäts-Determinierung des Proteins. Maßgebend ist das Moment der Denaturierung. Das von Natur denaturierte Gelatineprotein macht verzögerte Hautreaktion ohne Bildung anaphylaktischer Antikörper. Allgemein: beim Meerschweinchen führt die Injektion von durch Hitze denaturiertem Protein zu einer verzögerten Hautreaktion gegen das native Protein, während unter gleichen Bedingungen das native Protein sofort eine Arthusreaktion mit im Blute nachweisbaren Antikörpern bewirkt und *außerdem* eine verzögerte Hautreaktion, die zwar durch die Arthusreaktion verdeckt wird, aber doch mikroskopisch nachweisbar ist. Wenn es sich auch durch Überkreuzreaktionen nachweisen läßt, daß der verzögerte Reaktionstyp weniger scharf spezifisch ist, so stellt die verzögerte Reaktion tatsächlich eine empfindlichere Immunitätserscheinung dar, als die auf zirkulierenden Antikörpern beruhende Antigen-Antikörper-Reaktion. Jede Denaturierung setzt zwar die Antigenität herab und verleiht dabei eine «Neuspezifität», aber die der Proteinstruktur tief innewohnende, stabile und sehr schwer zerstörbare Eigenschaft bleibt erhalten und ist fähig, eine verzögerte Hautreaktion gegen das gleiche native Protein zu vermitteln. Während die lokale Arthusreaktion auf Grund erwor-

bener zirkulierender und passiv übertragbarer Antikörper sofort bei Antigen-Injektion und Antigen-Kontakt einsetzt, beruht die verzögerte Reaktion nicht auf zirkulierenden Antikörpern und ist daher nicht durch Serum übertragbar. Sie wird durch Zellen vermittelt, welche erst nach Infiltrierung der Injektionsstelle eine dadurch verzögerte Reaktion auslösen. BENACERRAF und GELL (1959) konnten nun feststellen, daß beide Arten von Reaktionen (verzögerte Haut-Reaktion und Kontakt-Reaktion) Reaktionsfolgen des gleichen antigenen Stimulus (zum Beispiel Pikrylchlorid) sind.

Bei Behandlung der Meerschweinchen mit heterologem Protein-Pikryl-Konjugat überwiegt die verzögerte Hautreaktion an Intensität. Nach Behandlung mit Pikryl allein ist die Kontakt-Reaktion stärker ausgeprägt. Den Ausschlag für die jeweilig stärkere Intensität gibt die zeitliche Folge der Antikörperbildung. Die zellgebundene Immunität ist ein früheres Stadium als die Bildung zirkulierender Antikörper. Ist beim Konjugat das Eiweiß homolog – und somit schwach antigen – so ist auch das gesamte Konjugat relativ schwach antigen und weniger wirksam als bei heterologem Trägerprotein und dadurch mitbedingter gesteigerter Hapten-Antigenität. Die geringere Antigenität homologer Haptenkonjugate reicht noch aus zur Bildung des verzögerten Reaktionstyps, so daß es möglich ist, daß Tiere mit verzögerter Reaktion auf geringere Antigenreize reagieren als zur Erzeugung zirkulierender Antikörper nötig ist.

Übertragen wir diese Erkenntnisse der Allergieforschung auf die Zellulartherapie, so bedingt die Injektion von gelöstem Antigen, das auch bei subcutaner oder intramuskulärer Injektion in die Zirkulation gelangt, die Bildung von Antikörpern aus Plasmazellen, die im Blute nachweisbar sind und gegebenenfalls Serumkrankheitssymptome allgemeiner wie auch lokaler Art (Arthusreaktion) auslösen können. Antikörper dieser Art werden bei jeder Zellulartherapie nach Maßgabe der mitinjizierten gelösten Eiweißmenge gebildet. Diese Antikörper machen sich daher in der Regel klinisch erst dann bemerkbar, wenn die injizierte Antigenmenge relativ groß ist, gleichzeitig Zellen von verschiedenen Tierarten gegeben werden, das Intervall bis zur Wiederholungsreaktion relativ kurz ist und ganz besonders aber, wenn intravenös injiziert wird. Alle diese Faktoren begünstigen in bekannter Weise das Auftreten

von anaphylaktischen Reaktionen und von Serumkrankheit. Gelöstes Eiweiß, das bei jeder Zellsuspension mitinjiziert wird, bewirkt zwangsläufig die Bildung von Antikörpern. Die Hauptmenge des injizierten Zellmaterials besteht aber aus Gewebeelementen, Zellverbänden und Einzelzellen, deren Eiweiß bei der Frischzellen-Methode zwar nicht denaturiert aber artfremd ist und somit vollantigen wirksam wird. Bei der Trockenzelltherapie kann man annehmen, daß durch die lyophile Trocknung eine wenn auch geringfügige Denaturierung des nativen Eiweißes erfolgt.

NIEHANS bevorzugt für die Organzellulartherapie fetale Zellen oder solche von ganz jungen Tieren. Dafür mag es therapeutische Gründe geben. Aber die Ansicht, daß solche Zellen eine geringere anaphylaktisierende Fähigkeit im Vergleich zu Zellen erwachsener Tiere haben, hat zu Widersprüchen geführt.

Nach F. KNÜCHEL (1954) entspricht das aus Trockenzellen gelöste Eiweiß elektrophoretisch dem Serum-Eiweiß der betreffenden Tierart. Auf Grund gemeinsam mit W. KUHN durchgeführter Versuche (1954) schrieb KNÜCHEL: «Durch Sensibilisierung von Meerschweinchen und Kaninchen mit Suspensionen getrockneter Organpulver oder mit eiweißhaltigen Extrakten aus solchen, die von fetalen tierischen Organen stammten, ließ sich keine Allergisierung erzeugen, die zum anaphylaktischen Schock oder zu Schockfragmenten Anlaß gab, wohl dagegen durch Vorbehandlung mit entsprechenden Antigenen aus Organen erwachsener Tiere.»

Das kann für die Tiere der gleichen Art zutreffen und würde bedeuten, daß der Fetus noch nicht die Organzellen-Spezifität besitzt, die sich später im Leben nach der Geburt ausbildet. Immerhin fanden H. GRÜBER (1955) und H. KLEINMAIER (1955) auch fetale Organzellen für erwachsene Tiere antigen, was im Grunde auf Unterschiede in der Proteinstruktur hinweist.

Die Natur variiert fortgesetzt, so daß es nicht nur eine Artspezifität gibt, sondern innerhalb der Art auch eine Individual-Spezifität (Fingerabdruck beim Menschen), die bis zur Zellspezifität geht. Die Spezifizierung beginnt schon mit der Bildung von Ekto-, Meso- und Entoderm aus der Zygote und geht weiter, so daß im gleichen Organismus die Zellen eine Gewebs- und Organspezifität erlangen. Verändert sich diese – zum Beispiel durch Infektion – so kann u. a. eine Organ-Autoantikörper-Bildung die Folge sein. Andererseits

bleiben gewisse antigene Potenzen den Zellen von Mensch und vielen Tieren gemeinsam (Fr. A. SIMON 1934). Daran muß man denken, wenn W. KUHN und F. KNÜCHEL (1954) feststellten, «daß die nach Injektion tierischer Organe (Schaf) beim Menschen gebildeten Antikörper sich nicht nur gegen Antigene des homologen tierischen Organs richteten, sondern auch mit den homologen menschlichen Organen reagierten». Das bedeutet eine über die Artspezifität reichende Organspezifität.

Durch die Bildung spezifischer Antikörper gegen injizierte Gewebezellen verbindet sich mit der Zellulartherapie die Möglichkeit gewisser Gefahren.

Die bei der Herstellung der Präparate aufgewendete Sorgfalt erlaubt, die Gefahr der Übertragung pathogener Krankheitserreger (Virus, Bakterien, Protozoen, Parasiten) vom Tier auf den Menschen auszuschließen. Eine Unsterilität bei der Herstellung der Präparate läßt sich ebenfalls verhindern. Die mit der Zellulartherapie verbundenen Gefahren sind somit nur durch die Gegebenheiten des Patienten bedingt.

Da ist zunächst an die Möglichkeit der Allergie gegen das artfremde Gewebe zu denken. Die Serumtherapie kennt diese Allergie besonders gegen Pferdeprotein. Aber für die Zellulartherapie werden Zellen benutzt von Rindern, Schweinen und hauptsächlich von Schafen. Es sind zudem Gewebe von Feten oder von ganz jungen Tieren. Die bisher gewonnene beachtlich große Erfahrung hat gezeigt, daß primäre Allergie gegen das Protein dieser Tiere sehr selten ist. Immerhin empfiehlt es sich, mit dem Normalserum-Eiweiß dieser Tierarten eine intracutane Injektion (0,01 ml) als Vorprobe zu machen. Eine möglicherweise innerhalb von Minuten auftretende Reaktion würde auf eine gefährliche Allergie des Patienten hinweisen. Aber es gibt Patienten, die zwar die erste Zellinjektion reaktionslos vertragen, aber schon bald danach – auf Grund zirkulierender Antikörper – eine Überempfindlichkeit erwerben, die nach kurzer Zeit (eventuell nur 1 Woche) eine zweite Zellinjektion der gleichen Tierart gefährlich macht.

Die relativ häufige Allergie gegen Pferdeprotein bringt es mit sich, daß zum Beispiel eine antitoxische Serumprophylaxe gegen Tetanus mit Rinder- oder Schaf-Tetanusantitoxin gemacht wird. Das gleiche gilt für das Diphtherieantitoxin. Wenn einige Zeit später Zellu-

lartherapie erfolgt, ist mit Anaphylaxiegefahr zu rechnen. Ebenso kann eine vorher mit Schaf-, Schweine- oder Rinderzellen durchgeführte Zellulartherapie Überempfindlichkeit hervorrufen, so daß eine spätere Trockenzellinjektion dann einen gefährlichen Kollaps auslöst. Ob eine intracutane Hautprüfung in *jedem* Falle einen gefährlich werdenden Überempfindlichkeitszustand erkennen läßt, ist leider unsicher. Diese Prüfung sollte aber nicht unterbleiben, wenn sich aus der Anamnese die Möglichkeit ergibt, daß eine Überempfindlichkeit bereits erworben wurde.

Die bei Zellulartherapie injizierte antigene Substanz führt sowohl zur Bildung von zirkulierenden Antikörperglobulinen als auch zur Bildung von Zellen, die bei Kontakt mit den injizierten antigenen Substanzen eine Reaktion auslösen können. Wenn künstlich intracutan erzeugt, kann diese Reaktion vom Typ der verzögerten Hautreaktion sein. Diese Zellen können am Orte der zellulartherapeutischen Injektion eine Reaktion bedingen, die klinisch einem verzögerten, relativ milde verlaufenden Arthusphänomen ähnelt. Sie würde also nicht der – besonders bei wiederholten Zellinjektionen – schnell einsetzenden und durch zirkulierende, anaphylaktische Blutantikörper verursachten Arthusreaktion entsprechen, sondern *neben* dieser klinisch unbemerkt ablaufen. Es scheint zwei Arten dieser reaktionsvermittelnden Zellen zu geben: bei Tieren die von CHASE (1945) festgestellten lymphocytären Zellen und beim Menschen die von LAWRENCE (1952) festgestellten granulierten Leukocyten. Letztere sind auch als Extrakt noch zur Reaktionsübertragung befähigt, auf Grund von spezifischen Reagenzien, die der Mensch selbst bei Agammaglobulinaemie zu bilden imstande ist (LAWRENCE 1959). Die Natur dieses Übertragungsfaktors ist noch Gegenstand weiterer Forschung, deren Ergebnisse abzuwarten sind, bevor man Genaueres über die rein zellulär bedingten spezifischen Reaktionen aussagen kann.

Selbst eine unter der klinisch erkennbaren Schwelle ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktion bedeutet für den menschlichen Organismus eine vegetative Belastung, so daß damit beim Patienten neben einer allergisch bedingten oder anaphylaktisch erworbenen Reaktionsbereitschaft noch andere Gegebenheiten zu beachten bleiben, auf die H. G. RIETSCHEL (1957) ausführlich hingewiesen hat.

Spezielle immunbiologische Probleme der heterologen Gewebeimplantation

VON DR. MED. J. STEIN, HEIDELBERG

Nach intramuskulärer Injektion von heterologen Zellsuspensionen können immunbiologische Reaktionen verschiedener Intensität ablaufen. In ihrer Art unterscheiden sie sich zum Teil von den in der Immunbiologie bisher bekannten Reaktionsabläufen. Die Immunvorgänge nach Zellimplantationen muß der Therapeut kennen, um Zwischenfällen vorbeugen zu können.

Bevor die Ergebnisse der Zellulartherapie vorlagen, herrschte die Ansicht, daß eine wiederholte parenterale Injektion von tierischem Fremdeiweiß stets einen schweren anaphylaktischen Schock auslösen müsse. Beobachtungen an hunderttausenden von Zellinjektionen geben Anlaß, diese Auffassung zu revidieren. Die Empirie hat gezeigt, daß Überempfindlichkeitsreaktionen nach Zellimplantation relativ selten sind.

HEINTZ (1954) beschrieb eine Purpura rheumatica (Morbus Schönlein-Henoch) mit Fieber, Hautblutungen, rheumatoiden Gelenkschmerzen, Haematurie und Darmblutungen bei einem wegen einer Adipositas mit Trockenzellen behandelten 60jährigen Mann. Es waren Gewebe von Hypothalamus, Niere und Placenta vom Kalb injiziert worden. HEINTZ sah die Ursache dieser allergisch-hyperergischen Gefäßreaktion in der parenteralen Verabfolgung von Kalbsgewebe. Die Erkrankung trat 14 Tage nach der Injektion auf – ein Intervall, das von der Serumkrankheit her bekannt ist. Einige Stunden vor Ausbruch der Purpura hatte der Patient eine größere Portion von Kalbsbries verspeist. Diese Mahlzeit ist möglicherweise eine Zufuhr von Antigenen gewesen.

UHLENBRUCK (1955) schilderte den Fall eines 8jährigen Jungen, der an schwerer Nephrose litt. Wenige Stunden nach Injektion von Trockenzellen der Niere und der Placenta bekam der Junge Schüttelfrost, hohes Fieber, Meningismus, petechiale Blutungen und Schleimhautblutungen. Die schwere hämorrhagische Diathese hielt 2 Tage an. Dann setzte eine starke Diurese ein und die Eiweiß-Ausscheidung hörte auf. In den folgenden 3 Wochen zeigten sich Blutbildveränderungen wie bei einer Agranulocytose. Wiederum 10 Tage später waren alle Blutwerte normalisiert. Eine Nachkontrolle 2 Jahre später ergab normale Nierenfunktion. – Einer schweren Immunreaktion nach Trockenzellimplantation mit bedrohli-

chen Stress-Symptomen folgte in diesem Fall eine bemerkenswerte Heilung eines chronischen Nierenleidens.

BRAUCH veröffentlichte 1956 einen Fall von Polyneuritis und Polyradiculitis mit encephalo-myelitischen Erscheinungen bei einem 52jährigen Mann, der Frischzellen-Aufschwemmungen (Nebenniere vom Schwein, Testis und Hypothalamus vom Kalb, Placenta und Herz vom Kalbsembryo) erhalten hatte. Ob es sich dabei um eine serogenetische Polyneuritis auf Grund einer Immunreaktion nach Art eines neuroallergischen Mechanismus handelte, wurde jedoch nicht geklärt. Symptome und Verlauf der Erkrankung konnten ebensogut als infektiöse, virusbedingte Polyneuritis gedeutet werden.

Drei weitere Zwischenfälle immunbiologischer Genese wurden von HOFF 1957 bekanntgegeben. Einem 61jährigen Mann wurden wegen postcommotioneller, vegetativer Beschwerden dreimal nacheinander in Abständen von 4 Tagen Placenta-Frischzellen intramuskulär injiziert. Kurz nach der letzten Injektion entwickelte sich ein anaphylaktischer Schock mit akutem Nierenversagen und Lungenödem, dem der Kranke erlag.

Ein 73jähriger Patient, der einen apoplektischen Insult durchgemacht hatte und an Angina pectoris-Anfällen litt, erhielt von seinem Hausarzt mehrfach Trockenzellinjektionen von Placenta. 3 Tage nach der letzten Injektion bildeten sich ein Hautausschlag und Purpura-ähnliche Hautblutungen. Der Patient kam später an einer frischen beidseitigen Thrombose der Arteria femoralis, Thrombosen der Milzvene und der Pankreasvene ad exitum. HOFF deutete diesen Fall als allergische Gefäßreaktion nach Trockenzellenimplantation mit nachfolgender Thrombose.

Ein 26jähriger Patient, der an subchronischer Nephritis litt, erhielt 1953 und 1954 von seinem Hausarzt Trockenzellinjektionen von Placenta, Niere und Hypothalamus. Blutdruck und Albuminurie besserten sich danach für einige Wochen. Nach der 3. Injektion trat ein anaphylaktischer Schock mit Urticaria und Schmerzen in der Herzgegend auf. Die akuten allergischen Symptome klangen unter klinischer Behandlung ab. Der Patient ist dann später, als Folge seiner chronischen Nephritis, im Coma uraemicum gestorben.

1957 berichteten REITZ und SCHOOP über einen tödlich verlaufenen anaphylaktischen Schock nach Trockenzellinjektion. Ein 45jähriger Mann, in dessen Anamnese sich eine Nesselsucht und eine anaphylaktische Reaktion nach Tetanus-Serum-Injektion fanden, begab sich wegen Abgespanntheit und Potenzschwäche in hausärztliche Behandlung. Nachdem Vitaminpräparate nicht wirkten, injizierte der Arzt zwei Ampullen Trockenzellen vom Kalbshoden. 12 Stunden nach Injektion entwickelte sich ein anaphylaktischer Schock mit Hirnödem, an dem der Patient starb. Nach Vorgeschichte, Symptomatologie und Obduktionsbefund wurde die Trockenzellimplantation als Ursache der zum Tode führenden anaphylaktischen Reaktion angesehen.

Jellinger und Seitelberger beschrieben 1958 eine akute tödliche Entmarkungs-Encephalitis nach wiederholten Hirntrockenzellen-Injektionen. Der 51 jährige Patient litt seit seinem 47. Lebensjahr an einem progredienten, linksseitigen Hemiparkinson, der gegen die übliche medikamentöse Therapie resistent blieb. Deswegen wurden von einem praktizierenden Nervenarzt innerhalb eines Zeitraumes von anderthalb Jahren insgesamt 7 Injektionsserien lyophil getrockneter Zellen des Hirnes vom Kalb verabfolgt. Es wurden gegeben: Großhirnrinde, Thalamus, Hypothalamus, Striatum und Placenta. 22 Tage nach der 7. Serie – die beschwerdefrei vertragen worden war – trat plötzlich eine Halbseitenschwäche rechts auf, die rasch zunahm. 7 Wochen nach der letzten Injektion verstarb der Patient in einer neurologischen Klinik unter den Zeichen eines rasch progredienten cerebralen Prozesses. Die Obduktion ergab neben den typischen Veränderungen eines endogen-degenerativen Morbus Parkinson das Bild einer akuten Entmarkungs-Encephalitis. Jellinger und Seitelberger vermuteten einen kausal-pathogenetischen Zusammenhang zwischen den wiederholten parenteralen Applikationen von tierischem Hirngewebe und der Entmarkungs-Encephalitis, die sie als immunbiologisches Geschehen deuteten.

Rietschel besprach in seinem Buch «Problematik und Klinik der Zellulartherapie» (Urban & Schwarzenberg, 1957) mehrere Fälle mittlerer und schwererer immunbiologischer Reaktionen nach Zell-Implantation, die er teils selbst beobachtet hatte, teils von Kollegen mitgeteilt bekam. Einige dieser Fälle sind identisch mit den hier referierten.

Die Zellulartherapie wurde in größerem Umfange erst ab 1953 ausgeübt. Die hier zusammengestellten Komplikationen immunbiologischer Art nach Zellinjektion ereigneten sich bis 1958. Die Gesamtzahl der zwischen 1953 und 1958 in Deutschland, Österreich und der Schweiz durchgeführten Zellimplantationen läßt sich nur schätzen. Aus Unterlagen der Deutschen Gesellschaft für Zellulartherapie und aus Angaben des Werkes, das die Trockenzellpräparate herstellt, läßt sich überschlagen, daß in diesen 5 Jahren mindestens 600000 Zellinjektionen gemacht wurden. Im Verhältnis zu dieser großen Zahl ist der Anteil an schweren immunbiologischen Reaktionen klein.

Die meisten dieser Komplikationen wären nicht eingetreten, wenn die Zellulartherapie vorschriftsgemäß und nur bei geeigneten Indikationen angewendet worden wäre. Kontraindikationen wie die chronische Nephritis oder infektiös-entzündliche Erkrankungen wurden nicht beachtet. Entgegen der Vorschrift wurden die Zellinjektionen in kurzen Zeitabständen wiederholt. Die Zwischenfälle sind

in solchen Fällen nicht der Methode zur Last zu legen, sondern die Folge einer fehlerhaften Anwendung. HOFF hat auch betont, daß die eingetretenen Todesfälle und die schweren Schädigungen nach Zellimplantationen nicht als *Therapieschäden* im Sinne von LETTERER anzusehen seien, sondern als *Therapiefehler.*

Auch RIETSCHEL – der 1955 eine systematische Umfrage über Zwischenfälle bei der Zellulartherapie durchführte und die Ergebnisse publizierte – hat betont, daß 90 % der Komplikationen bei gewissenhafter Anwendung und genauer Indikationsstellung hätten vermieden werden können.

Mit zunehmender Erfahrung und Kritik bei der Anwendung der Zellulartherapie hat sich in der Tat die Zahl der Zwischenfälle wesentlich verringert. Ernstere Schädigungen durch Zellimplantationen, insbesondere schwere Überempfindlichkeitsreaktionen, sind in den letzten Jahren nicht mehr mitgeteilt worden.

Aus Unterlagen der Deutschen Gesellschaft für Zellulartherapie errechneten sich für die Jahre 1959 und 1960 auf tausend Zellimplantationen durchschnittlich 5 bis 6 Fälle von leichten bis mittleren allergischen oder anaphylaktischen Reaktionen. Beobachtet wurden Temperaturerhöhungen, Juckreiz und Quaddeln an der Injektionsstelle, lokale Ödeme, Urticaria und Exantheme. Durch Antihistaminika, Calciuminjektionen und gegebenenfalls Cortison ließen sich diese Störungen meistens schnell beheben.

In den seltensten Fällen reagierte der Patient sofort nach erstmaliger Zellinjektion. Eine solche allergische Spontanreaktion kann entstehen, wenn «Reagine» vorhanden sind, die vom Patienten infolge früherer Berührung mit dem korrespondierenden Antigen gebildet wurden. Dieses Antigen kann zum Beispiel ein Serumpräparat von der gleichen Tierart gewesen sein, oder aber es wurden – was selten vorkommt – ganze Eiweißmoleküle aus dem Fleisch der Nahrung resorbiert. Der von HEINTZ mitgeteilte Fall ist ein Beispiel für diese Möglichkeit.

Die meisten Überempfindlichkeitsreaktionen traten einige Tage bis zu zwei Wochen nach der Zellinjektion auf. RIETSCHEL hat beobachtet, daß Zwischenfälle in der Zeit zwischen dem 7. bis 14. Tage post injectionem auftraten. Eine Überempfindlichkeit in diesem zeitlichen Abstand zur Zelleinspritzung beruht auf echter anaphylaktischer Reaktion zwischen Antigenen und Antikörpern, so wie

wir es von der Serumkrankheit her kennen. Diese Zwischenfälle können entstehen, wenn Zellinjektionen in kurzen Zeitabständen wiederholt wurden. Nach der ersten Injektion bildeten sich Antikörper, mit denen die Zellantigene aus den späteren Einspritzungen reagierten.

Aus Untersuchungen von KUHN und KNÜCHEL wissen wir, daß nach Zellinjektionen in den meisten Fällen die Antikörper 3 bis 4 Monate im Serum nachweisbar sind. Eine Wiederholung von Zellinjektionen sollte demnach frühestens nach 3 bis 4 Monaten, besser erst nach 5 bis 6 Monaten erfolgen.

In der Zellulartherapie werden Suspensionen aus Frisch- oder Trockenzellen injiziert. Bei der Herstellung der Suspension geht ein Teil des Zelleiweißes in Lösung. Bei der Deutung immunologischer Reaktionen müssen wir unterscheiden zwischen diesem gelösten, sofort resorbierbaren Eiweiß und dem Struktureiweiß der Zellen, das später und langsamer aufgenommen wird.

Wir haben die Mengen des in einer Suspension von Frisch- oder Trockenzellen gelösten Eiweißes bestimmt. Nach Untersuchung von Suspensionen verschiedener Organarten haben wir als Mittelwert gefunden, daß aus den 100 mg Trockensubstanz einer Ampulle «Siccacell» Leber 15,3 mg Eiweiß in Lösung gehen. In Frischzellsuspensionen findet sich in einer 10-cm^3-Spritze etwa die doppelte Menge an gelöstem Eiweiß – vermutlich deshalb, weil bei der Frischzelltechnik mehr Zellen mechanisch zerstört werden.

Die Eiweißmengen, mit denen man in der Zellulartherapie umgeht, sind gering; aber es ist artfremdes Eiweiß, dessen Moleküle antigen wirken. Wenn trotzdem anaphylaktische Zwischenfälle so selten sind, kann das zwei Gründe haben:

1. Es ist möglich, daß das Struktureiweiß aus dem injizierten Zelldepot so langsam und in so kleinen Mengen resorbiert wird, daß es desensibilisierend wirkt.
2. *Fetale* Zellen haben nur eine geringe antigene Potenz. Sie wirken nicht anaphylaktogen und lösen beim Empfänger keinen vollen Immunmechanismus aus.

KUHN und KNÜCHEL führten 1953 die ersten systematischen immunbiologischen Untersuchungen zur Zellulartherapie durch. Sie injizierten intramuskulär bei Menschen gefriergetrocknete, in phy-

siologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte, fetale tierische Gewebe verschiedener Organarten. Mit Hilfe der Kollodium-Partikel-Reaktion konnten sie dann im Menschenserum Antikörper gegen wäßrige Extrakte dieser Organe nachweisen. Die Antikörper traten vom 2. bis 3. Tag post injectionem auf und waren bis zu mehreren Monaten im Serum nachweisbar. Diese nach parenteraler Gabe fetaler Schafsorgane gebildeten Antikörper präzipitierten nicht nur mit den korrespondierenden Organ-Antigenen des Tieres, sondern auch mit Antigenen der gleichen menschlichen Organe. Sie präzipitierten hingegen nicht – oder nur erheblich schwächer – mit anderen Organen von Schaf und Mensch. Absättigung der Antikörper mit tierischem Eiweiß des gleichen Organs änderte die präzipitierende oder agglutinierende Kraft gegenüber entsprechenden menschlichen Organen nicht oder nur ganz geringgradig. KUHN und KNÜCHEL schlossen aus diesen Versuchsergebnissen, daß die Injektion tierischer Gewebe sowohl zur Bildung von organspezifischen Hetero- als auch von Auto-Antikörpern gegen die zur Injektion verwendete Organart führe.

Ob es sich hierbei um echte Autoantikörper gehandelt hat, wurde später von ROTHER (1955) bezweifelt, da echte Autoantikörper nur durch antigenen Reiz körpereigener Substanzen entstehen sollen. Ein solcher auslösender Mechanismus ist nach ROTHERS Meinung für Sensibilisierungsvorgänge nach Injektion von Zellaufschwemmungen noch nicht erwiesen. Er sah keinen Anlaß, von der näherliegenden Erklärung abzurücken, daß die Organspezifität über die Spezies-Spezifität dominiere. Ein Überdecken der spezies-spezifischen durch organspezifische Dominanten ist in der Serologie bekannt. Diese Erscheinung erklärt sich aus dem Vorkommen gleichartiger spezifischer Organantigene in vielen Tierarten.

VORLAENDER hat die möglichen Beziehungen zwischen autoimmunologischen Vorgängen und den Immunreaktionen nach Zellulartherapie am Modell der Masugi-Nephritis zu klären versucht. Diese experimentelle Nephritis – die unter natürlichen Bedingungen nicht auftritt – zeigte stärkere histologische Veränderungen an den Malpighischen Körperchen, wenn Nephrotoxin und Nierentrockenzellen zu gleicher Zeit gegeben wurden. Wurden die Nierenzellen aber 10 oder 15 Tage nach dem Nephrotoxin gegeben, so blieb ein nachteiliger Einfluß aus.

Den Ergebnissen dieses Tierexperimentes entsprach die klinische Erfahrung, daß akute Glomerulonephritiden durch Zellulartherapie verschlechtert werden. Zellinjektionen galten allerdings bei dieser Erkrankung auf Grund der empirischen Beobachtungen schon von Anfang an als kontraindiziert. VORLAENDER erklärte seine Befunde als Verstärkung oder erneute Provokation der Auto-Immunisierung. Er vermutete eine nahe Verwandtschaft zwischen Auto-Immunisierung und immunbiologischen Vorgängen nach Zellulartherapie.

ROTHER konnte bei seinen Versuchen mit der Masugi-Nephritis nach Injektionen von fetalen Hammel-Nierenzellen in keinem Fall das Auftreten von Antikörpern gegen Extrakte der injizierten Zellen oder auch gegen Extrakte aus gesunden oder kranken Kaninchennieren nachweisen. Seiner Meinung nach sind fetale Zellen bei nephritiskranken Tieren genau so wenig antigen wie bei gesunden.

MOENCH – der ebenso wie ROTHER an der SARREschen Klinik Immunversuche zur Zellulartherapie durchführte – prüfte den Einfluß heterologer Gewebstrockenzellen auf die experimentelle Nephritis des Kaninchens (Masugi-Nephritis). Gab er Trockenzellen der fetalen Niere am gleichen Tag mit dem Nephrotoxin, so zeigte sich ein aggravierender Effekt, der im histologischen Bild und in den klinischen Befunden nachweisbar war. Insoweit wurden die Befunde von VORLAENDER bestätigt. Diese nachteilige Wirkung stellte MOENCH aber nur für Nierentrockenzellen fest. Wurden in gleicher Versuchsanordnung Placenta-Trockenzellen zusammen mit dem Nephrotoxin injiziert, so trat die Aggravation nicht ein. Wurden die Nierentrockenzellen erst am 10. Tage nach der Nephrotoxingabe gegeben und die Tiere dann zwischen dem 40. und 50. Tage nach Versuchsbeginn getötet, so hatten – wie das auch VORLAENDER mitteilte – die Nierenzellen keinen nachteiligen Einfluß. MOENCH stellte sogar einen günstigen Effekt fest, denn bei den mit Nierentrockenzellen behandelten Tieren war gegenüber den Kontrollen das nephrotische Syndrom weniger ausgeprägt. Daraus läßt sich schließen, daß Nierentrockenzellen bei *frischen* entzündlichen Nierenerkrankungen das Krankheitsbild verstärken, während sie bei *chronischen* Nierenleiden – nach Abklingen des akut entzündlichen Stadiums – eine günstige therapeutische Wirkung haben.

In diesem Zusammenhang sind die Versuche von DAMMIN und Mitarbeitern interessant. Sie beobachteten, daß Patienten mit chro-

nischer Nephritis und Urämie homologe Hauttransplantate länger tolerierten, als es gewöhnlich der Fall zu sein pflegt.

Bei Nierenkranken wird man in der Beurteilung immunologischer Verhältnisse den veränderten Eiweißstoffwechsel, insbesondere Alterationen in der Gammaglobulin-Fraktion, berücksichtigen müssen.

Über die Frage, ob nach Zellulartherapie echte Autoantikörper gebildet werden, herrscht also noch keine Einigkeit. Aber die Tatsache, daß intramuskulär injizierte *fetale* Frisch- oder Trockenzellen schwache Antigene sind und kaum anaphylaktogen wirken, wurde von den meisten Nachuntersuchern bestätigt.

Mit dieser Beobachtung stimmen allerdings die tierexperimentellen Befunde KLEINMAIERS nicht ganz überein. Er untersuchte, ob ein Organismus durch die Behandlung mit Trockenzellen sensibilisiert wird, so daß im Falle einer Injektion von Serum derselben Tierart ein anaphylaktischer Schock entstehen könne. Es sollte mit diesen Versuchen für die ärztliche Praxis festgestellt werden, ob die therapeutische Anwendung von Trockenzellen Konsequenzen habe für eine spätere Serumprophylaxe oder Serumtherapie, die immer einmal erforderlich werden kann. Mit Absicht wählte KLEINMAIER eine extreme Versuchsanordnung. Er nahm die hochempfindlichen Meerschweinchen als Versuchstiere und löste den Schock nicht durch intravenöse, sondern durch intracardiale Injektion aus. Unter diesen eingreifenden Versuchsbedingungen konnte er nachweisen, daß es möglich ist, bei Meerschweinchen durch einmalige Behandlung mit Trockenzellen der Placenta oder der fetalen Leber eine Schockbereitschaft zu erzeugen. Nach intracardialer Re-Injektion von Serum derselben Tierart wurden anaphylaktische Erscheinungen ohne tödlichen Ausgang (Schockfragmente) oder typische Schockzustände mit Todesfolge beobachtet. Es war dabei nicht von Bedeutung, ob die vorangehende Sensibilisierung mit Trockenzellen durch intramuskuläre oder intraperitoneale Applikation erfolgt war.

Anaphylaxieexperimente zur Zellulartherapie waren von GRÜBER schon 1955 durchgeführt worden. Er sensibilisierte Kaninchen durch fünfmalige Injektion von Trockenzellen aus Kalbsschilddrüse. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Die Antikörperbildung wurde mittels der Präzipitinreaktion des Serums der Versuchskaninchen gegen Kälberserum geprüft. Wurde den sensibilisierten Tieren auf

der Höhe ihrer Antikörperbildung Kälberserum intravenös injiziert, so trat bei einigen ein anaphylaktischer Schocktod ein. Die Auslösung dieses Schocktodes war allerdings nur möglich, wenn die zur Sensibilisierung vorangegange Trockenzelleninjektion intraperitoneal erfolgt war. Wurden die Trockenzellen intramuskulär gegeben – wie es in der Therapie üblich ist –, so trat der Schocktod nach der auslösenden intravenösen Re-Injektion nicht auf.

Bei Beurteilung der GRÜBERschen Versuche ist zu berücksichtigen, daß er nicht fetale, sondern adulte Jungtiergewebe zur Sensibilisierung verwendete, deren anaphylaktogene Eigenschaft nicht in Frage steht.

Die für die Zellulartherapie behauptete schwache Antigenwirkung *fetaler* Zellen deckt sich mit Untersuchungsergebnissen von MEDAWAR und Mitarbeitern. Sie fanden, daß eine immunbiologische Toleranz induziert werden kann, solange im fetalen Leben die Immunreaktionen noch nicht entwickelt sind. Der immunbiologische Mechanismus, der die Antikörper hervorbringt, reift erst gegen Ende des intrauterinen Lebens – bei manchen Tieren, zum Beispiel Ratten, erst nach der Geburt.

Injiziert man einem Feten ausgereifte Zellen eines anderen Tieres, so bildet er keine Antikörper gegen diese Antigene – auch nicht nach der Geburt. Hautüberpflanzungen von demselben Spendertier heilen daher reaktionslos ein.

BILLINGHAM nannte dieses Phänomen «aktiv erworbene Toleranz» und sah darin ein spezifisches, systemgebundenes Versagen der immunbiologischen Reizbeantwortung.

Bei Gewebeüberpflanzungen zwischen adulten Individuen werden Antikörper nicht nur vom Empfänger gegen das Implantat gebildet, sondern es bilden auch die implantierten Zellen selbst Antikörper gegen die Antigene des Wirtsgewebes. Diese Reziprozität besteht infolge der Unreife ihres Immunsystems *nicht* bei Überpflanzung fetaler Gewebe. Implantierte fetale Zellen bilden keine Antikörper gegen die Gewebe ihrer neuen Umgebung.

Dieser Sachverhalt macht es verständlicher, warum nach Injektionen *fetaler* Zellen anaphylaktische Reaktionen praktisch kaum vorkommen.

Überempfindlichkeitserscheinungen nach Zellulartherapie werden vorwiegend verursacht durch Zellen, die vom Jungtier entnom-

men werden müssen, wie zum Beispiel Testis, Ovar, Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere. Es ist daher anzuraten, in der Zellulartherapie – soweit möglich – Organe fetaler Provenienz zu bevorzugen.

Die Placenta muß hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften zu den adulten Geweben gerechnet werden. Sie vermag zu sensibilisieren. Nach Placentainjektionen können starke Rötung und Juckreiz in der Umgebung der Einstichstelle auftreten. Diese Symptome sind fälschlicherweise auch schon als «Rotlauf» gedeutet worden. Es handelt sich dabei nicht nur um anaphylaktische Erscheinungen, sondern auch um die Auswirkung von hyperämisierenden, histaminoiden Placenta-Wirkstoffen, wie sie schon von SCHWARZ beschrieben wurden. Einfache kühle Umschläge bringen diese Symptome in kurzer Zeit zum Abklingen.

Alles in allem ist die Gefahr allergischer oder anaphylaktischer Zwischenfälle bei der Zellulartherapie gering. Komplikationen lassen sich weitgehend vermeiden, wenn folgende Regeln beachtet werden:

1. Eine fraktionierte Zellulartherapie mit verzettelten Dosen innerhalb kurzer Zeitabstände sollte wegen der Gefahr der Sensibilisierung unterbleiben. Die für erforderlich gehaltenen Injektionen verschiedener Zellarten sind in einer Sitzung zu verabfolgen. Eine Wiederholung darf nicht vor Ablauf von 5 bis 6 Monaten erfolgen.
2. Es sind die gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie bei der Serumtherapie zu beachten: der Patient ist zu befragen, ob er vorher Serum bekommen hat und gegebenenfalls von welcher Tierart.
3. Es ist zu klären, ob eine allergische Reaktionsbereitschaft vorliegt. Dazu muß in der Anamnese geforscht werden nach Milchschorf, Ekzemen, Asthma, Heufieber und Migräne.
4. In Zweifelsfällen soll eine intracutane Vorprobe gemacht werden mit 0,1 cm^3 von der überstehenden Flüssigkeit der Zellsuspension.

Die intracutane Vorprobe gewährt zwar keine absolute Sicherheit, aber sie ermöglicht es doch, Patienten zu erfassen, die vorsensibilisiert sind oder zu exzessiven Immunreaktionen neigen.

Für die Zellulartherapie ist die individuelle immunologische Reaktionsbereitschaft des Patienten von Bedeutung nicht nur im Hin-

blick auf anaphylaktische Zwischenfälle, sondern auch hinsichtlich der Aufnahme und Verwertung des implantierten Gewebes.

HALSTED hatte bereits 1909 in Hundeversuchen für die autologe und isologe Transplantation endokriner Drüsen nachgewiesen, daß die immunologische Abwehr um so geringer war, je mehr sich die korrespondierende Drüse in Unterfunktion befand und demnach ein Bedürfnis für das Transplantat bestand. Dieses sogenannte Halsted-Prinzip läßt sich erweitern auf alle durch chronische degenerative Erkrankungen funktionsgestörten Organe.

Die Intensität des Immunmechanismus steht in Beziehung zur Funktionsfähigkeit des RES. Beziehungen zwischen dem immunbiologischen Zustand des haematopoetischen Systems und dem Alter sind bekannt. Da die Zellulartherapie Alterungsvorgänge im Sinne einer Revitalisation zu beeinflussen vermag, erschien es sinnvoll, die Auswirkung von Zellinjektionen auf gewisse immunbiologische Leistungen zu untersuchen, um auf diesem Wege vielleicht einen Maßstab zur Objektivierung zellulartherapeutischer Erfolge zu gewinnen. MÖSE, WENNIG und STEIN führten in den letzten zwei Jahren Untersuchungen in dieser Richtung durch. Eine Altersabhängigkeit der sogenannten Gruppenstrukturen spezifischen Blutes ist bekannt (THOMSON und KETTEL). Es nehmen aber nicht nur die A-, B-, O-Isoagglutinine, sondern auch die Hetero-Agglutinine mit zunehmendem Alter ab. Bei beiden Arten handelt es sich um Normalantikörper, die vom Reticuloendothel auch ohne antigenen Reiz gebildet werden.

Als Kriterium für die zellulartherapeutischen Untersuchungen dienten die Hetero-Haemagglutinine. Bei der Hetero-Haemagglutination handelt es sich bekanntlich um den Vorgang, daß menschliches Serum Blutzellen verschiedener Tierarten zu agglutinieren vermag. Der Titer der Haemagglutinine steigt nach der Geburt bis zum zweiten Lebensjahr steil an, bleibt etwa bis zum 25. Lebensjahr hoch und fällt dann allmählich ab.

An zahlreichen Patienten untersuchten MÖSE, WENNIG und STEIN, ob die altersbedingten Titer der Hetero-Haemagglutinine durch verschiedene geriatrische Behandlungsmethoden veränderbar sind. Die stärksten Titersteigerungen fanden sie nach Injektion einer Ampulle «Siccacell»-Placenta. Einen Monat nach intramuskulärer Injektion einer Ampulle «Siccacell»-Placenta stieg der Titer im

Durchschnitt auf das 63,8fache an. Eine Titersteigerung um das 29fache ergab sich nach Injektion von «Siccacell»-Testis. Nach anderen Organarten, wie zum Beispiel Leber und Herz, traten nur mäßige oder keine Titersteigerungen auf. Bei Kontrolluntersuchungen nach Eigenblutinjektionen, nach haematogener Sauerstofftherapie, Röntgen-Bestrahlungen oder forcierter Antibiotika-Therapie konnte kein entsprechender Titeranstieg beobachtet werden.

Es wurden verschiedene Krankheiten, bei denen die Zellulartherapie Anwendung findet, in die Versuche einbezogen, wie zum Beispiel arteriosklerotische Involutionen, coronare und periphere Durchblutungsstörungen, vegetative Dysregulationen, Erschöpfungs- und Rekonvaleszenzzustände.

Die klinische Beurteilung des zellulartherapeutischen Erfolges geschah getrennt von der serologischen Untersuchung. Dabei ergab sich, daß Patienten, die eine kräftige und anhaltende Revitalisation zeigten, auch meistens eine ausgeprägte und lang dauernde Titersteigerung aufwiesen. Demgegenüber hatten die Patienten, bei denen die klinische Wirkung ausblieb, keine Titersteigerung.

Diese Zusammenhänge dürfen nicht dazu verleiten, den Wirkungsmechanismus der Zellulartherapie allein als einen Eingriff in die immunbiologische Reaktionsweise des Organismus zu erklären. Dagegen spricht schon die Tatsache, daß erhöhte Hetero-Haemagglutinations-Titer ausbleiben nach Injektion von Zellen der Leber und des Herzens und daß trotzdem gute klinische Wirkungen zu beobachten sind.

Es scheint so zu sein, daß gewisse Zellarten, in erster Linie Placenta und Testis, eine allgemeine Revitalisation und Stoffwechselsteigerung auslösen, die sich gleichzeitig an der Leistungsfähigkeit des RES auswirkt. KMENT hat diesen Revitalisationseffekt im Tierversuch objektiviert.

Für die Zellulartherapie sind die kausalen Beziehungen zwischen den immunbiologischen Vorgängen und dem therapeutischen Effekt noch nicht genügend geklärt.

Der immunologische Mechanismus der Zelle

VON PROF. DR. F. SCHMID, HEIDELBERG

Es stand nie ernsthaft im Zweifel, daß die immunologischen Grundvorgänge in Zellen ablaufen und die Antikörperbildung in den Zellen vor sich geht. Um so erstaunlicher ist es, daß die Immunologie über Jahrzehnte hinweg eine «serologische» Wissenschaft blieb, gleichsam also die nachgeordneten sekundären und tertiären Probleme in den Mittelpunkt der Forschung und Didaktik stellte. Je nach der Art ihrer Wirkung in vivo oder in vitro wurden die Reaktionsprodukte der Zellen in Körperflüssigkeiten quantitativ durch Verdünnungsreihen in qualitativ spezifischen Ansatzreihen gemessen. Erst in den letzten Jahren ist man zunehmend in das Zentrum der immunologischen Fundamentalvorgänge vorgedrungen und glaubt, auch eine ganz bestimmte Zellform, die sogenannten «Plasmazellen» für die Antikörperbildung verantwortlich machen zu können.

Unter Immunologie verstehen wir alle der Integrität der artspezifischen Individualität dienenden Vorgänge. Jeder Fremdstoff, der in einen lebenden Organismus gelangt – organisch, anorganisch, Viren, Bakterien, Pilze, Zellen, Gewebe – wird der Eigengesetzlichkeit des Empfängerorganismus unterworfen. Diese wird gewahrt durch die immunologischen Abwehrvorgänge, als deren Träger die Zellen des aktiven Mesenchyms anzusehen sind. Dazu gehören die Stammgewebe und Derivate des reticulären und lockeren Bindegewebes. Studien am lockeren Bindegewebe des Mesenteriums und Omentums liegen den nachfolgenden Darstellungen über den immunologischen Mechanismus der Zelle zugrunde.

Umbau mesenchymaler Zellen als immunologischer Fundamentalvorgang

Träger der immunologischen Abwehrvorgänge sind die Gewebe und Zellderivate des aktiven Mesenchyms. Dazu gehören die lympho-reticulären (Lymphknoten, Milz, Thymus, Knochenmark) und lockeren (Omentum, Peritoneum, Pleura, Gelenkhäute, Leptomeninx, Unterhaut-) Bindegewebe. Neben diesen Stammgewe-

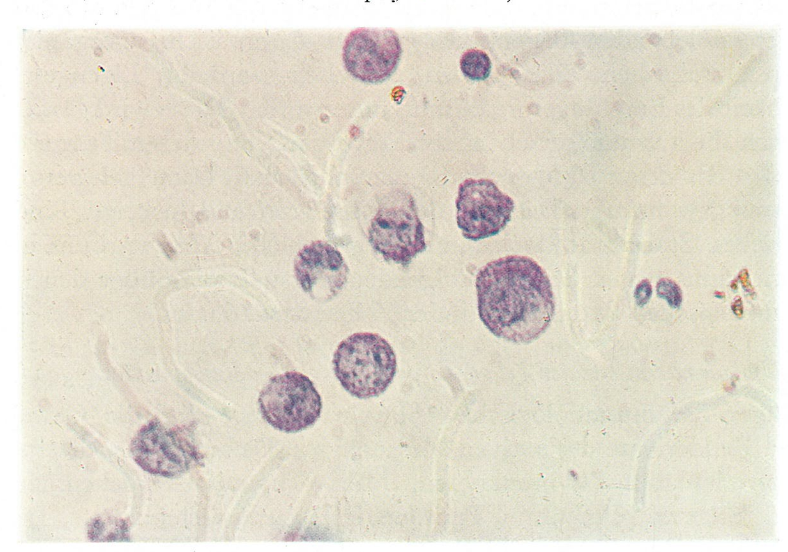


Abbildung 48 a und b

Nucleotidfärbung mit Toluidinblau

a) Zellen nicht immunisierter Tiere. Die Nucleotide sind vorwiegend in den Kernen.

b) Peritonealexsudatzellen immunisierter Tiere. Reichlich Nucleotide werden im Cytoplasma nachweisbar. Metachromatische Partikel im Cytoplasma (saure Mucopolysaccharide).



ben enthalten alle anderen Organe mesenchymale Gewebe in geringerer Menge.

Die nachfolgenden Studien wurden vorwiegend an Zellderivaten des Omentums und Peritoneums durchgeführt; hier ist die Möglichkeit gegeben, Analysen an Einzelzellen frei von humoralen Faktoren durchzuführen. Die Zellzahl wird dabei durch ein unspezifisches Reizexsudat erhöht (SCHMID und HAGGE). Die Untersuchungen über die immunologischen Fundamentalvorgänge in der Zelle beziehen sich auf:

1. Veränderungen des Zell-Differentialbildes.
2. Cytochemische Aufschlüsse über intrazelluläre Stoffwechselvorgänge.

Die Gültigkeit der Aussage beschränkt sich vorläufig auf den verzögerten Typ der Allergie, da hier die Vorgänge im Zeitlupentempo ablaufen und dadurch besser faßbar sind. Die Befunde können aber als repräsentativ für die Reaktionen des aktiven Mesenchyms angesehen werden, auch wenn es quantitativ-graduelle Unterschiede unter den verwandten Geweben geben mag.



Abbildung 49
Ribonucleinsäureausfällungen im Cytoplasma sensibilisierter Tiere mit Übergang in kristalloide Strukturen (Methylgrün-Pyroninfärbung).

Auf einen unspezifischen Reiz (hier: je nach Gewicht 5–20 ml Paraffinöl intraperitoneal) kommt es zu einer Zellanreicherung im Peritonealraum. Dabei herrschen zunächst die polynucleären Zellen vor. Im Laufe von Tagen nimmt diese Zellform ab, die Mononucleären treten in den Vordergrund (s. SCHMID und HAGGE 1953). Bei sensibilisierten Tieren (BCG-Sensibilisierung) sind beim quantitativ und qualitativ gleichen Reiz primär mehr Mononucleäre vorhanden.

Im Längsschnitt betrachtet, laufen während einer Sensibilisierung folgende Vorgänge ab. Innerhalb von vier Tagen nimmt die Zahl der Polynucleären rasch ab. Im Differentialzellbild werden die großen Mononucleären vom Monocytentyp vorherrschend. Der Kern dieser Zellen ist locker strukturiert, das Cytoplasma schwach gefärbt, im Farbton grau-blau bis grau-blau-rötlich. Bei Beginn der registrierbaren Überempfindlichkeit (Hyperergie) ändern sich Größe und Struktur dieser Zellen zunehmend.

Zunächst wird im Cytoplasmainnern um das Centrosom ein basophiler Verdichtungsbezirk sichtbar, aus welchem ein zentripetal sich ausbreitendes Ergastoplasmagerüst herausragt. Die Hauptstrukturen dieses Gerüstes sind radiär orientiert. Im Laufe der nun folgenden Wochen beherrschen die großvolumigen, basophilen Zellen das Differentialbild; sie werden wegen des großen Cytoplasmaraumes «Plasmazellen» genannt. Diesen Plasmazellen (Abbildungen 50 und 51) wird die Antikörperbildung zuerkannt. Im Laufe unserer jahrelangen Studien mit und an diesen Zellen haben sich jedoch andere Kausalzusammenhänge ergeben. Nicht die «Plasmazellen» sind primär, sondern die Stoffwechselleistungen und -produkte des Sensibilisierungsprozesses formen die Mononucleären zu Plasmazellen um. Sie sind «*unreif*», wenn das Ergastoplasma und die basophilen Substanzen um das Centrosom liegen, im *Reifestadium* ist das Cytoplasma tief basophil, der Kern abgeplattet, randständig, das Cytoplasmavolumen beträgt ein Mehrfaches des Ausgangsvolumens (eines Monocyten). Bei «*überreifen*» Plasmazellen hat die Zellgröße wieder abgenommen, die basophilen Stoffwechselprodukte finden sich in der Peripherie der Zelle oder in cytoplasmatischen Ausstülpungen. Diese Darstellungen beziehen sich auf Färbungen nach PAPPENHEIM.

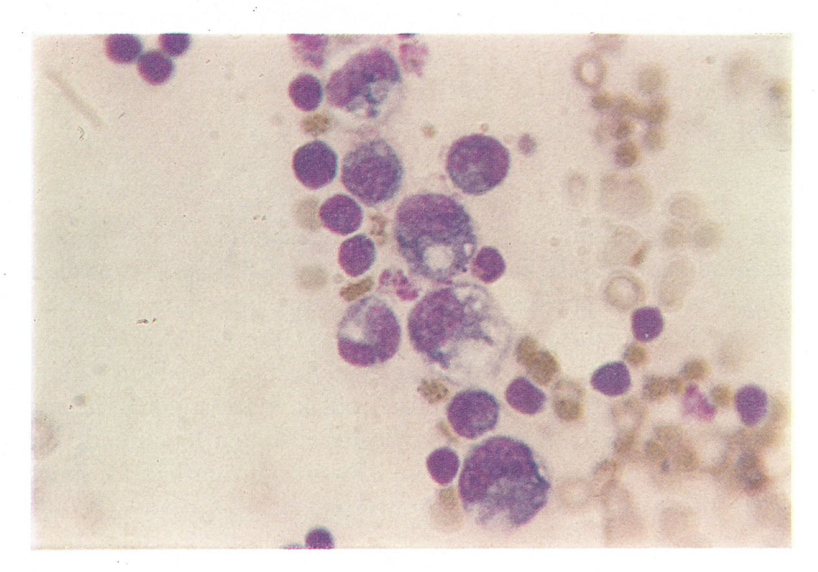


Abbildung 50
Sogenannte Plasmazellen mit starker Basophilie des Cytoplasmas und großem Zelleib.

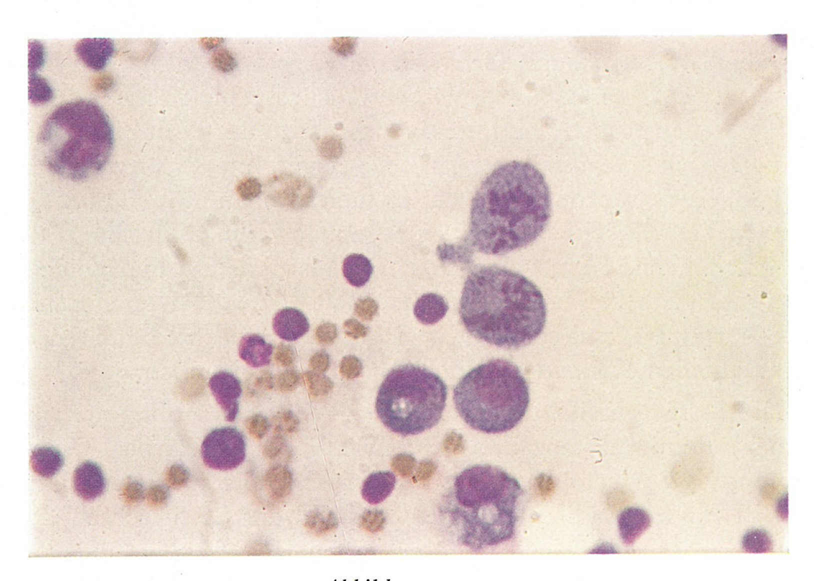


Abbildung 51
Sogenannte Plasmazellen, darunter zwei, die sich eben mitotisch geteilt haben.

Cytochemische Studien des immunologischen Mechanismus

Die immunologische Umstimmung eines Organismus ist durch die Umbauvorgänge an den Einzelzellen recht gut in den Grundzügen zu erkennen. Mittels

Toluidinblaufärbungen

(zum Nachweis von Nucleinsäureverbindungen) erkennt man eine Zunahme von Nucleinsäurekomplexen im Cytoplasma. Während normalerweise damit das Cytoplasma kaum oder nur schwach gefärbt wird (Abbildung 48a), füllt sich das Cytoplasma während der Sensibilisierung zunehmend intensiver, bleibt allerdings inhomogen (Abbildung 48b). Dabei werden mit zunehmender Reife metachromatische Farbareale sichtbar. Speziell fallen leuchtende azurblaue Partikel auf. Die Metachromasie wird gewöhnlich als Zeichen eines Polymerisationsvorganges gewertet.

Methylgrün-Pyronin-Färbungen

dienen dem Nachweis von Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS). Damit ist eine Differenzierung der oben beschriebenen Nucleinsäurekomplexe im Cytoplasma möglich. In «ruhenden» Monocyten färbt sich der Kern mit Methylgrün intensiv grünblau, das Cytoplasma schwach rosa bis rosaorange. Die Plasmazellen färben sich intensiver mit Pyronin. Während der immunologischen Umstellung der Zelle zeigen rote Pyroninkomplexe Ribonucleinsäurekomplexe im Cytoplasma an (Abbildung 49). Diese scheinen sich zu kristalloiden, unter Polarisationsfiltern doppelbrechenden, Aggregaten zu polymerisieren. Ob die metachromatischen Partikel bei Toluidinblau mit den RNS-Komplexen bei MP-Färbung identisch sind, ist nicht unmittelbar zu beweisen, aus der zeitlichen Koinzidenz jedoch recht wahrscheinlich.

Die Stoffwechselleistung der Zelle umfaßt den Abbau der (antigenen) Fremdsubstanz und den Aufbau der Antikörper. Die Anreicherung des Cytoplasmas an unspezifischen Esterasen (Abbildung 55) ist nur ein Indikator für das Ausmaß der Stoffwechselleistungen. Daß es sich bei den synthetisierten RNS-Verbindungen tatsächlich um Antikörper handelt, beweisen die passiven Übertragungsversuche der Allergie. Mit den hier beschriebenen Zellen

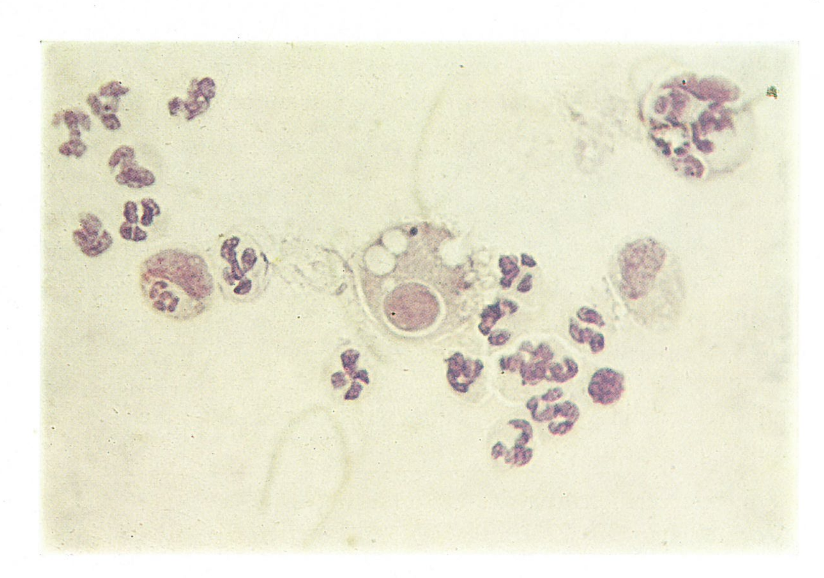


Abbildung 52
Phagocytose von Polynucleären durch große Makrophagen mit Basophilie und Ergastoplasma (Plasmazellen).

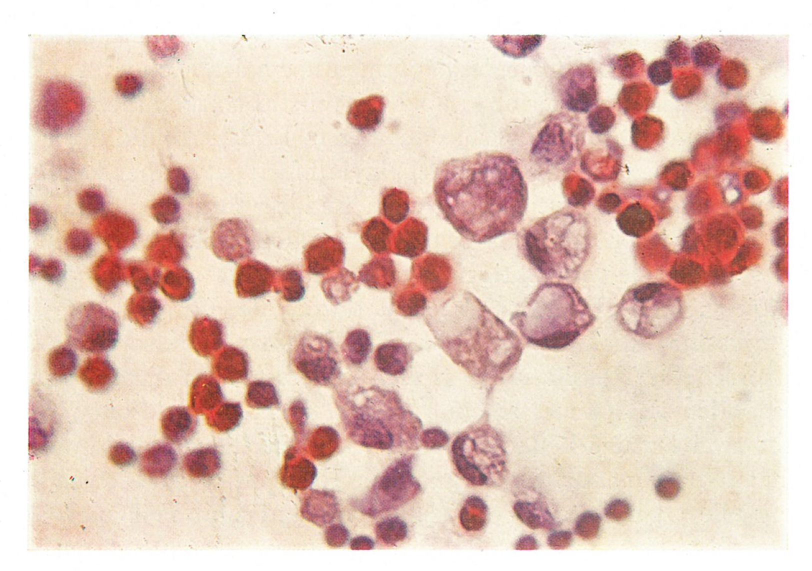


Abbildung 53
Phagocytose phosphatasehaltiger Leukocyten durch Plasmazellen.

läßt sich die Allergie vom Tuberkulintyp auf nichtsensibilisierte Tiere (Lit. s. F. SCHMID) übertragen (Abbildung 58); sie erlischt in zeitlicher Abhängigkeit von der Lebensdauer der übertragenen Antikörper (Eiweiße) innerhalb von 90 Tagen.

Hilfsmechanismen der Antikörpersynthese

Von der Dynamik der immunologischen Stoffwechselleistung bekommt man einen Eindruck, wenn man ein Zellpräparat auf dem Höhepunkt der Sensibilisierung – im Hyperergiestadium – untersucht. Die meisten Mononucleären befinden sich in irgendeinem Teilungs- bzw. Vermehrungsstadium. Die enorme zusätzliche Leistung der mesenchymalen Zellen wird durch folgende «Hilfsmechanismen» möglich:

1. Volumenvermehrung des Cytoplasma,
2. Vermehrung der Zellzahl,
3. Verwendung körpereigenen Materials.

Die Volumenvermehrung

der Zelle beschränkt sich auf das Cytoplasma und hat zur Begriffsbildung «Plasmazelle» beigetragen. Der Cytoplasmaraum liegt um ein Mehrfaches über den Volumen normaler Monocyten. Unter den Plasmazellen gibt es aber erhebliche Größenunterschiede, die nicht nur von der «Reife» abhängen. In den Abbildungen 50, 51, 52 kommen die Größen-Flächenrelationen gegenüber Lymphocyten, segmentkernigen Leukocyten und Erythrocyten zum Ausdruck. Offensichtlich erfordert die immunologische Umwandlung der Fremdstoffe vom Antigen zum Antikörper Raum, Energie und Material. Dem Raumbedarf wird durch die Vergrößerung des Cytoplasmas Rechnung getragen, das Ergastoplasma sorgt für eine entsprechende Stabilität des großen Zelleibes. Von diesen großen, basophilen Zellen mit einem randständigen, abgeplatteten Kern über zwei kernige Zellen bis zu den Riesenzellen (Abbildung 57) mit 24 Kernen, findet man auf dem Höhepunkt der Sensibilisierung alle Übergänge. Diese Zellformen sind zum Teil auch Ausdrucksform eines weiteren Hilfsmechanismus, der gesteigerten Teilungsaktivität.

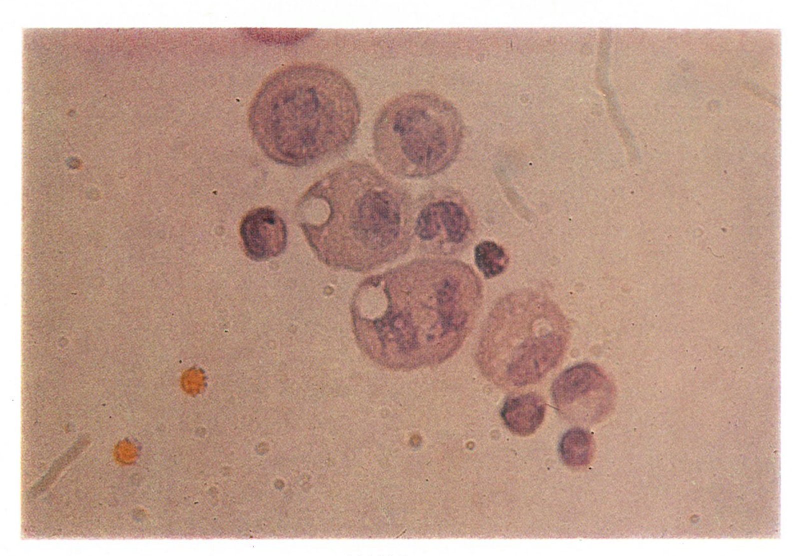


Abbildung 54
Gesteigerte mitotische Aktivität der großen Mononucleären auf dem Höhepunkt der Sensibilisierung.

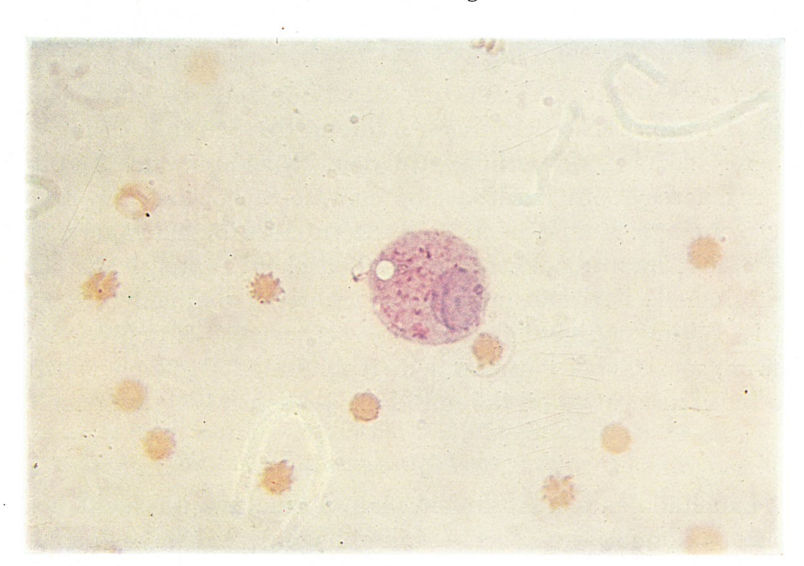


Abbildung 55
Gehalt an unspezifischen Esterasen der großen Mononucleären während des Sensibilisierungsprozesses.

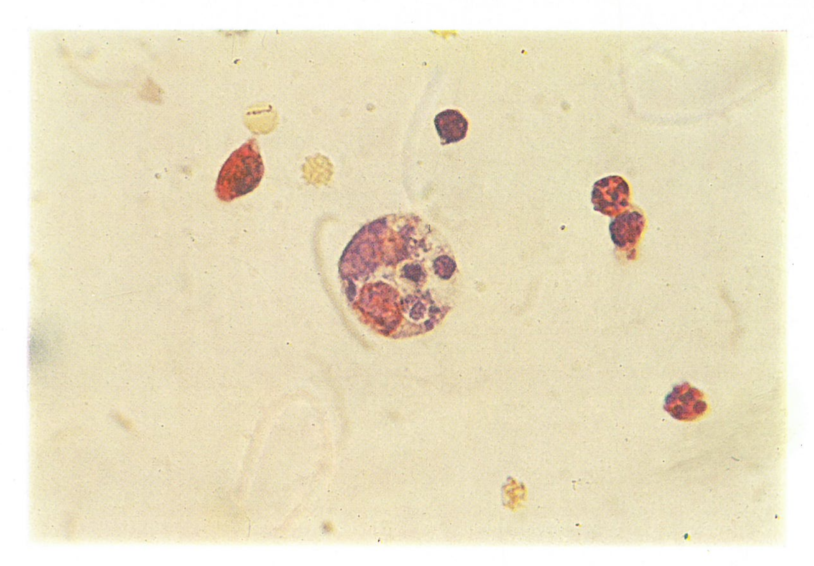


Abbildung 56
Phagocytose phosphatasehaltiger Zellen durch Plasmazellen.

Vermehrung der Zellzahl

Neben der Volumenvermehrung der Einzelzelle ist zur Bewältigung der Stoffwechselleistungen während der Sensibilisierung eine höhere Zellzahl erforderlich. Auf dem Höhepunkt der Sensibilisierung herrscht im Exsudat eine enorme Steigerung der Zellteilungsvorgänge. Auf wenigen Millimetern eines Objektträgerausstriches findet man alle Phasen der mitotischen Teilung, aber auch amitotische Zellvermehrungen scheinen vorzukommen.

Die Teilungsaktivität findet man vorwiegend bei den Mononucleären, speziell bei Plasmazellen (Abbildung 54). Nach vollzogener Sensibilisierung läßt die mitotische Aktivität langsam nach.

Verwendung von körpereigenem Zellmaterial

Im Bauchhöhlenexsudat findet man normalerweise nicht selten große mononucleäre Zellen (Makrophagen), welche segmentkernige Leukocyten phagocytiert haben. Die Phagocytosetätigkeit steigt während des Sensibilisierungsprozesses erheblich an, auf dem Höhepunkt der Sensibilisierung findet man in der Mehrzahl der

Mononucleären vom Plasmazelltyp ein bis mehrere Reste von Polynucleären. Bis zu sieben Segmentkernige wurden in einem Cytoplasmaleib objektiviert. Erst im Laufe unserer Untersuchungen wurde das Prinzip in der aktiven und passiven Phagocytose klar. Die jugendlichen Zellen wandeln sich bei Vergrößerung ihres Cytoplasmaleibes in Makrophagen um. Die segmentkernigen Leukocyten werden dann von den Mononucleären phagocytiert, wenn in ihrem Cytoplasma alkalische Phosphatasen nachweisbar werden (Abbildung 56). Da die Volumenvergrößerung mit der Phagocytoseaktivität parallel erfolgt, ist anzunehmen, daß die Phagocytose von körpereigenem Material ein ökonomisches Prinzip zur Gewinnung von Material und möglicherweise auch Energie darstellt.

Zusammenfassend lassen sich Sinn und Form der immunologischen Antwort folgendermaßen interpretieren:

Die immunologische Reaktion eines Organismus läuft dann an, wenn Fremdstoffe (Fremdeiweiße, Krankheitserreger) unter Umgehung des Verdauungskanals in den Körper gelangen. Während bei Aufnahme über den Verdauungstrakt ein physiologischer Abbau der Fremdsubstanzen bis zu Stufen erfolgt die einen Einbau der Stoffe in den Stoffwechsel des Organismus gewährleisten, ist dieser Abbau bei parenteraler (oder aerogener) Zufuhr den mesenchymalen Zellen überantwortet.

Die Zellen des aktiven Mesenchyms sind pluripotent. Aus der Vielzahl ihrer formativen und funktionellen Möglichkeiten (Phagocytose, Infektionsabwehr, Antikörperbildung, Keimlager für Bindegewebe und Blutbildung, Metaplasie) wird bei parenteralem Eindringen von organischen Fremdsubstanzen die Partialaufgabe des Intermediärstoffwechsels gesteigert. Dazu wird das System – das lockere und reticuläre Bindegewebe – aktiviert. Die mesenchymalen Zellen vergrößern während der Sensibilisierungsphase ihr Cytoplasmavolumen, durch verstärkte Teilungsprozesse wird die Zellzahl vermehrt, reife körpereigene Zellen werden in kaum vorstellbarem Maße als Material- und Energiequelle für die Stoffwechselsteigerung herangezogen.

Innerhalb der Zelle selbst läuft der Prozeß im – vergrößerten – Cytoplasma ab. Dabei scheint zentripetal der Abbau, eine Depolymerisation der Fremdsubstanz zu erfolgen. Im Bereich des Golgi-

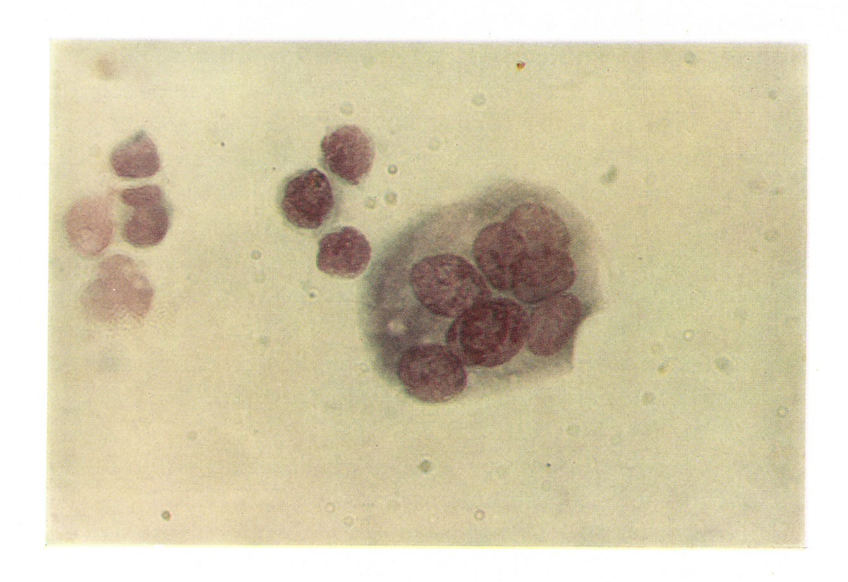
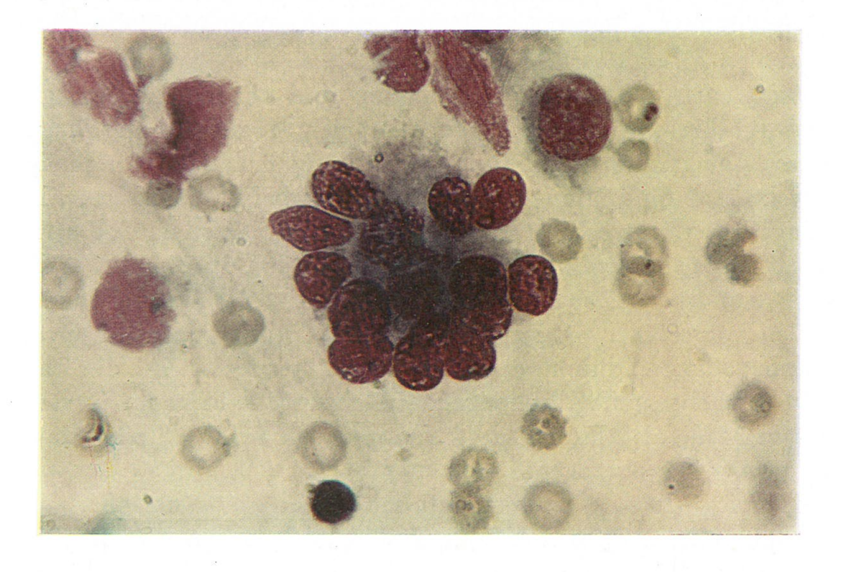


Abbildung 57 a und b
Riesenzellbildung in der Sensibilisierungsphase.
a) Achtkernige Riesenzellen mit großem Cytoplasmahof.
b) Sechzehnkernige Riesenzelle mit spärlichem Cytoplasma.



Apparates und der Mikrosomen beginnt der Umbau und die Syntheseleistung. Die Ribonucleinsäurekomplexe – welche Antikörpern entsprechen dürften – werden zentrifugal abtransportiert, dabei größer und schließlich von der Zellmembran aus mittels cytoplasmatischer Ausstülpungen ausgestoßen. Die Antikörperbildung dürfte nach unseren Beobachtungen ein Polymerisationsprozeß sein.

Die Form der mesenchymalen Zellen ist jeweils Ausdruck des Funktionszustandes. Auf dem Höhepunkt der Sensibilisierung, im Hyperergiestadium herrscht das Bild der sogenannten Plasmazellen vor, später treten die Mononucleären vom Monocytentyp wieder zunehmend in den Vordergrund.



Abbildung 58

Tuberkulinreaktionen bei tuberkulosefreien Meerschweinchen, welchen die Antikörper durch homologe Fremdzellen übertragen wurden.

Die Abhängigkeit der Immunreaktionen vom Blutgehalt des Implantats

VON PROF. A. VALLS CONFORTO, BARCELONA

Nach Injektionsimplantation heterologer Gewebe treten gelegentlich Immunreaktionen auf. Die klinischen Symptome sind vom Typ der «Allergie» und Folge einer in vivo ablaufenden Antigen-Antikörper-Reaktion.

Wir haben diese Phänomene seit 1948 im Anschluß an Zellimplantationen vereinzelt beobachtet und festgestellt, daß sie – wenn überhaupt – dann etwa am 9. Tag post injectionem auftraten. Es zeigten sich lokale und allgemeine Symptome, die aber niemals von ernsterer Art waren. Sehr selten traten diese Reaktionen schon nach der ersten Injektion von Zellsuspensionen auf. Sie waren häufiger bei Patienten, die eine zweite oder dritte Wiederholungsimplantation erhielten.

Mit zunehmender Erfahrung erkannten wir, daß die Häufigkeit solcher Reaktionen von dem verwendeten Implantationsmaterial abhing. Immunreaktionen traten öfter auf, wenn das implantierte Gewebe von jungen Tieren stammte und sehr selten, wenn es vom Feten kam. Unter den Organen fetaler Provenienz lösten Leber und Milz gelegentlich eine Reaktion aus. Nach Injektion fetaler Hirnzellen sahen wir hingegen nie allergische Phänomene. Von den Jungtierorganen verursachte die Nebenniere Reaktionen, während wir keine Immunreaktionen nach Implantation von Testisgewebe beobachteten.

Die Reaktionen nach Placentagewebe lagen in bezug auf Häufigkeit etwa in der Mitte.

Mit der Zeit erkannten wir einen Zusammenhang zwischen Häufigkeit sowie Stärke dieser Immunreaktionen und dem Grad der Vaskularisierung und dem Blutgehalt der verwendeten Gewebe. Wir bemühten uns deshalb nach Möglichkeit, das Restblut aus dem Implantat zu entfernen. Um das zu erreichen, betäubten wir die Spendertiere und bluteten sie bei schlagendem Herzen aus. Zusätz-

lich spülten wir die entnommenen Organe mit physiologischer Kochsalzlösung durch. Diese Maßnahmen waren jedoch zeitraubend, und es bestand die Gefahr einer Autolyse der Gewebe. Aus diesem Grunde änderten wir die Entnahmetechnik: nach schneller Tötung des Tieres wurden die Organe exenteriert und sofort in Stücke von etwa 2 mm^3 Größe zerkleinert, die dann in einer Hanks-Lösung von 25°C gespült wurden. Die Hanks-Lösung hat eine gewisse protektive Wirkung, so daß die Autolyse verzögert einsetzt. Die Gewebsaufschwemmung wurde vorsichtig geschüttelt und die Hanks-Lösung so oft erneuert, bis sie blutfrei blieb.

Aber auch bei diesem Vorgehen war nicht zu vermeiden, daß sich – vor allen Dingen im Placentagewebe – kleinere Blutkoagula bildeten. Um das zu verhindern, setzten wir der Suspensionslösung Dicumarol oder Natrium citricum zu. Die Lösung wurde anschließend auf ein pH von 7,3 eingestellt.

Wir waren uns bewußt, daß wir mit dieser Methode nicht alles Blut aus den Geweben entfernen konnten. Nachdem wir aber nur noch derart vorgewaschene Gewebesuspensionen implantierten, sahen wir kaum mehr Immunreaktionen bei den Patienten.

Bei einer Zellimplantation zu therapeutischen Zwecken wird antigenes Material von großer Vielfalt mit übertragen. Diese Antigene stammen aus der Lymphe, dem Blut und seinen verschiedenen Zellarten, dem Bindegewebe sowie aus den spezifischen Organzellen selbst. Zellantigene können aus der Zellwand intakter Zellen stammen oder aber aus dem Zellinnern zertrümmerter oder abgebauter Zellen. Auf Grund allgemeiner immunbiologischer Erfahrungen ist zu vermuten, daß besonders die Antigene aus dem Blutserum und den Blutzellen in hohem Maße sensibilisierend wirken. Unsere klinische Beobachtung einer Abnahme der immunbiologischen Reaktionen nach Eliminierung des Blutes aus dem Implantat stimmte mit dieser Erfahrung überein. Um diese Beobachtungen objektiv zu prüfen, führten wir serologische Untersuchungen durch:

Für die Tierversuche wurden weiße, weibliche Mäuse eines Inzuchtstammes verwendet, der seit 1941 in unserem Laboratorium gezüchtet wird. Zur Zeit der Versuche waren die Mäuse 3 Monate alt und wogen zwischen 18 und 20 g. Die weiblichen Mäuse waren gravide, bei einer Tragzeit von 12 bis 14 Tagen. Die Tiere wurden in Holzkäfigen gehalten von den Ausmaßen 50 × 30 × 30 cm. In jedem Käfig befanden sich maxi-

mal 12 Tiere. Verfüttert wurden: Gerste, Luzerne, Preßfutter mit Vitaminzusatz und Milchpulver.

Zu trinken erhielten die Versuchstiere Leitungswasser ad libitum. Die Temperatur im Tierstall wurde durch automatische Regelung konstant bei 22°C gehalten. Während des Tages herrschte diffuses Sonnenlicht. Während der Versuchszeit wurden die Tiere täglich inspiziert, und jede auffallende Veränderung wurde registriert.

Für die Versuche wurden die Tiere in 2 Gruppen zu je 12 weiblichen graviden Mäusen eingeteilt. Die Versuchsgruppe erhielt mit dem Trinkwasser 1 mg Dicumarol pro Tier. Die Kontrollgruppe erhielt keinerlei Medikamente.

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Von den Tieren der Kontrollgruppe wurden die Herzen der Feten entnommen und in eine Petrischale mit physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Aus der Gruppe der Dicumarol-Tiere wurden die Herzen der Feten ebenfalls entnommen, in der Mitte durchgeschnitten und vorsichtig in einer Hanks-Lösung mit Zusatz von Natrium citricum gewaschen, um das Blut zu entfernen.

Das Herzgewebe beider Versuchsgruppen wurde dann homogenisiert, indem es zunächst in einem Mörser zerrieben und anschließend durch ein Nylonsieb gedrückt wurde. Das Homogenat wurde in Kölbchen schlagartig tiefgekühlt auf –40°C.

Die Versuchsgruppen erhielten folgende Bezeichnungen: 1. Gruppe T (total): enthielt die Aufschwemmung von Herzgewebe mitsamt dem koagulierten Blut. 2. Gruppe G (gewaschen): enthielt die Aufschwemmung von Herzgewebe der Dicumarol-Tiere, das außerdem mit Hanks-Lösung + Natrium citricum gewaschen worden war.

Nunmehr wurde ein Gruppe von 16 Versuchskaninchen auf die Stabilität ihres Serums geprüft. Zu diesem Zwecke wurden Suspensionen aus Herzgewebe in Hanks-Lösung in einer Weise vorbehandelt, die später noch näher erläutert wird. Diese Suspensionen aus Herzgewebe wurden mit dem Serum der Kaninchen konfrontiert. Nur diejenigen Kaninchen wurden verwendet, deren Serum weder Trübung noch Präzipitation aufwies. Von den 16 Kaninchen wurde eines wegen Instabilität des Serums ausgesondert. Die Versuchskaninchen wurden in zwei Gruppen zu je 8 und 7 Tieren getrennt. Einer Gruppe wurde die Suspension G und der anderen die Suspension T injiziert.

Injektionstechnik

Jede Versuchsgruppe erhielt 3 Einspritzungen mit je 5 Tagen Zeitabstand zwischen den einzelnen Injektionen. Die erste Injektion enthielt 0,5 cm^3 und wurde intradermal gegeben. Die zweite Injektion von 1 cm^3 wurde intraperitoneal appliziert und die dritte von 0,5 cm^3 intravenös injiziert. In keinem Fall wurden anaphylaktische Schockphänomene beobachtet.

Zwei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere im Nüchternzustand durch die Vena marginalis des Ohres ausgeblutet. Das Blutkoagulum wurde zentrifugiert. Die Seren wurden jeweils zweigeteilt. Ein Teil wurde für individuelle Proben aufbewahrt, und der andere Teil wurde mit den anderen Seren der gleichen Versuchsgruppe zu einem «pool» vermischt. Bis zur Verwendung wurden alle Seren bei −12°C aufbewahrt.

Kontrolltechnik

Ein 40prozentiges Gelatinegel in physiologischer Kochsalzlösung wurde mittels Eiweiß geklärt und anschließend filtriert. Zu 100 cm^3 dieses Gelatinegels wurde ein Tropfen Octylalkohol zugefügt, um Schaumbildung zu verhindern. Ein Teil dieses Gelatinegels wurde auf sterile Haemolyseröhrchen verteilt. Einem anderen Teil des Gelatinegels wurde Serum Anti-G oder Serum Anti-T im Verhältnis von 1:5 zugefügt. Jedes Röhrchen enthielt 1 cm^3 Gelatinelösung. Die Ständer mit den Röhrchen wurden dann eine Stunde lang in einen Wärmeschrank bei 37°C gestellt. Dadurch floß die Gelatine, die an den Innenwänden der Röhrchen kleben geblieben war, herab. Die Röhrchen waren mit Silikon-Kautschuk verschlossen, um zu verhindern, daß die feine Gelatineschicht an den Wänden austrocknete.

Vom Wärmeschrank aus wurden die Ständer mit den Röhrchen sofort in einen Eisschrank gestellt, um bei einer Temperatur von +4°C die Koagulation und Konservierung sicherzustellen.

Im folgenden wird nun die bereits erwähnte Herstellung der Suspensionen aus Herzgewebe beschrieben:

Das Herzgewebe aus den Versuchsgruppen G und T wurde – jedes für sich – mit Siliciumsand in einem Mörser trituriert. Je 10 cm^3 der Suspenison wurde 1 Tropfen Toluol zugefügt, das mit Thymol

abgesättigt war. Die Suspensionen wurden dann etwa 15mal eingefroren und wieder aufgetaut und schließlich bei 4000 Umdrehungen/Min. und einer Temperatur von +4°C zentrifugiert. Die überstehende, opaleszierende Flüssigkeit wurde mit einer Pipette abgesaugt und in einem Eisschrank aufbewahrt, bis sie zur Durchführung der Reaktionen wieder gebraucht wurde. Die Suspensionen wurden, solange sie noch kalt waren, den Röhrchen mit Gelatinegel zugesetzt und die Röhrchen dann in einem Wärmeschrank 24 Stunden lang bei 22°C aufbewahrt. Die Ständer mit den Röhrchen standen dabei in einem Kristallisationsgefäß. Bevor die Ständer am nächsten Tage wieder aus dem Wärmeschrank genommen wurden, wurde das Kristallisationsgefäß mit Eiswasser gefüllt. Dadurch konnten wir nach wenigen Minuten die Röhrchen herausheben, ohne durch die Bewegung die einzelnen Schichten der Präzipitation zu verwischen. Der ganze Vorgang wurde dann noch einmal bei einer Temperatur von 37°C im Wärmeschrank wiederholt.

Folgende Proben wurden durchgeführt:

1. Einfache Gelatine mit Überschichtung von: physiologischer Kochsalzlösung, Suspension aus Organen G, Suspension aus Organen T.
2. Gelatine plus Antiserum G und Überschichtung von: physiologischer Kochsalzlösung, Suspension aus Organen G, Suspension aus Organen T.
3. Gelatine plus Antiserum T mit Überschichtung von: physiologischer Kochsalzlösung, Suspension aus Organen G, Suspension aus Organen T.

Ergebnisse

Keines der Röhrchen mit Überschichtung von physiologischer Kochsalzlösung zeigte eine Trübung oder auch nur eine Zone der Opaleszenz.

Alle Röhrchen mit Überschichtung von Organextrakt zeigten in der Kontaktzone eine Schicht von dichtem Präzipitat.

Die Röhrchen, in denen der Faktor T enthalten war, zeigten unter der genannten Zone eine weitere Trübungszone von einigen Zentimetern Dichte. Diese Trübungsschicht muß als echte Reaktionszone gedeutet werden.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser serologischen Versuche beweisen, daß die Blutkoagula oder das Blutserum, die in einer Gewebesuspension noch enthalten sind, eine Präzipitationsreaktion auszulösen vermögen. Werden also einem Patienten zu therapeutischen Zwecken Gewebesuspensionen injiziert, die vorher nicht blutfrei gewaschen wurden, so kann es infolge der sich bildenden Präzipitine zu immunologischen Komplikationen kommen. Es ist daher zu fordern, daß Spendergewebe vor der Überpflanzung möglichst blutfrei gewaschen werden.

Nachdem wir diese Voraussetzung erfüllten, haben wir praktisch keine Symptome immunologischer Unverträglichkeit mehr nach Gewebeimplantationen gesehen.

Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß für das Waschen der Spendergewebe nur das für diesen Zweck geeignete Natrium citricum verwendet wird. Natrium citricum vermag Eiweiß zu denaturieren und kann daher toxisch wirken, vor allen Dingen, wenn es eine alkalische Reaktion hat. Das gewöhnliche Natrium citricum (Natrium citricum neutrale oder Trinatriumsalz der Zitronensäure) reagiert schwach alkalisch. Dieses Natrium citricum muß dann exakt auf ein pH von 7,3 eingestellt werden. Besser ist es jedoch, man verwendet das Natriumhydrogencitrat (Mono-Natriumcitrat oder Natriumcitrat sauer). Seitdem wir auch diese Vorschrift beachten und alle Gewebe, die wir zu implantieren beabsichtigen, in einer Hanks-Lösung mit Zusatz von Mono-Natriumcitrat versehen und die Lösung dann auf exakt pH 7,3 einstellen, haben wir keinerlei Unverträglichkeitserscheinungen mehr gesehen.

Wirkungsspezifität



Wirkungsspezifität von Zellinoculaten beim embryonalen und heranwachsenden Organismus

VON DR. G. ANDRES, MAINZ

Die antigenische Spezifität des injizierten Materials

Werden lebende Zellen von einem Organismus in einen anderen transplantiert, so interessiert die Reaktion des Wirtes auf die fremden Zellen ebenso wie das Verhalten und das weitere Schicksal dieser Zellen in ihrer fremden Umgebung. Die Reaktion des Wirtes und damit auch das Schicksal des Transplantats mögen verschieden sein, je nachdem ob embryonale, juvenile oder adulte Zellen verwendet werden; aber auch der Implantationsort, das Alter des Wirtes und die Größe des Inoculums mögen von Bedeutung sein. Generell läßt sich heute schon sagen, daß heterologe Zellen (das heißt solche einer anderen Art) im adulten Wirbeltier kaum Aussicht auf dauerndes Überleben haben; selbst bei homologen Zellen (das heißt solchen eines anderen Individuums der gleichen Art) ist die Wahrscheinlichkeit von Unterschieden in wichtigen Gewebeverträglichkeitsgenen (SNELL 1957) zwischen Wirt und Implantat so groß, daß die fremden Zellen in der Regel schon nach kurzer Zeit einer Immunreaktion des Wirtes zum Opfer fallen (MEDAWAR 1957). Beispielsweise gehen Hauthomoplantate bei der Maus durchschnittlich nach 10–12 Tagen zugrunde, während Zweitimplantate vom gleichen Spender, die kurze Zeit nach dem Zerfall der Erstimplantate eingesetzt werden, durchschnittlich nur 6 Tage überleben. Diese Beziehung gilt nicht nur für Säugetiere ganz allgemein, sondern ebensosehr für Vögel und selbst für Fische und Amphibien (HILDEMANN 1956, 1957, 1958, HILDEMANN und HAAS 1959, 1960, 1961, HILDEMANN und OWEN 1956).

BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR (1956) stellten fest, daß eine spezifische Immunisierung gegen ein Hauttransplantat nur durch kernhaltige Zellen gelingt, nicht aber durch Serum oder durch Säugererythrocyten. Außer den ganzen Zellen erwiesen sich aber auch deren Kernfraktionen als wirksam. Mechanisches Zerstören durch Ultraschall beeinträchtigte ihre antigenische Spezifität nicht,

dagegen ging sie durch Lyophilisation der Zellen verloren. Als wirksame Substanzen sind verhältnismäßig niedermolekulare, vermutlich lipoidhaltige Aminosäuren-Polysaccharidkomplexe festgestellt worden (MEDAWAR 1957, 1958).

Weiter zeigte sich, daß nicht nur adulte, sondern auch embryonale Zellen eines Spenders befähigt sind, Transplantationsimmunität auszulösen (CHUTNA und HAŠKOVA 1959; HAŠEK 1960). Die Gene, welche für die Antigenbildung verantwortlich sind, werden schon sehr früh in der Ontogenese wirksam. Außerdem zeigte sich bei den verschiedenen Geweben eines Organismus gleiche Spezifität: ein Wirt, der durch Injektion von Leukocyten, Thymocyten oder Nebennierenrinde gegen einen Spender sensibilisiert wird, reagiert auf ein späteres Hauttransplantat in gleicher Weise wie nach Sensibilisierung durch ein erstes Hauttransplantat (MEDAWAR 1958).

Im Gegensatz dazu zeichnen sich gewebespezifische Antigene (wie Linsen- oder Testisantigene) durch eine vergleichsweise geringe Art- und Individualspezifität aus. Bei wiederholter Applikation, insbesondere bei gleichzeitiger Zugabe von Freundschem Adjuvans, können sie sogar eine Autoimmunreaktion auslösen, das heißt eine Reaktion der immunologisch kompetenten Zellen des Wirtes gegen die entsprechenden körpereigenen Gewebe (FREUND, LIPTON und THOMSON 1953, LAWRENCE 1959).

Art und Entwicklung der Immunreaktion des Wirtes

Im Hinblick auf den Immunmechanismus des Wirtes erschien es naheliegend, daß cytotoxische oder andere Serumantikörper maßgeblich an der Zerstörung der Transplantate beteiligt sind. Diese Annahme bewahrheitete sich jedoch nur teilweise. Auch massive Injektion von Sera immunisierter Tiere beschleunigte den Zerfall von Hauthomoplantaten kaum (vergleiche MEDAWAR 1958). Wurden die Immunsera intravenös appliziert, so ergab sich sogar eine merkliche Verlängerung der Lebensdauer. Dieser paradox erscheinende und auch heute noch nicht voll verstandene Effekt wurde von KALISS, GORER und SNELL (vergleiche KALISS 1958) in zahlreichen Arbeiten sehr eingehend untersucht. Es zeigte sich, daß starke Immunisierung das Überleben homologer Tumorzellen im allgemeinen herabsetzt, am deutlichsten bei Ascitestumoren, die kein kompaktes Gewebe bilden. Vergleichbar dürfte diese Wirkung mit

der «white graft reaction» bei Hyperimmunisierung gegen Hauthomoplantate sein (CHUTNA und POKORNA 1961). Leichte Immunisierung bewirkt dagegen bei manchen, aber nicht bei allen Tumoren eine beträchtliche Erhöhung ihrer Virulenz («enhancement»-Effekt). Man kann annehmen, daß die Serumantikörper diffusible Transplantatantigene abfangen («walling-off»-Effekt) und dadurch die Sensibilisierung der regionalen lymphatischen Zentren verlangsamen; dadurch erhalten die Tumoren Zeit, die immunologische Abwehr des Wirtes zu überrunden und den Wirt umzubringen. KALISS (l.c.) erwägt aber auch eine Änderung des Tumorstoffwechsels in Gegenwart von Serumantikörpern.

Durch ein sehr elegantes Experiment bewies ALGIRE (1957), daß sich Homoplantate der verschiedensten Gewebe auch in Anwesenheit von Serumantikörpern in vivo erhalten können: das zu testende Gewebe wurde in poröse Membranen eingeschlossen und in immunisierte Wirte implantiert. Hier erhielten sich die Gewebe so lange lebensfrisch, als Membranen verwendet wurden, deren Porenweite das Eindringen von Zellen verhinderte, nicht aber den Durchtritt spezifischer Proteine. Wurden dagegen gewaschene Lymphocyten immunisierter Tiere zusammen mit dem zu testenden Gewebe in die Membran eingeschlossen und implantiert, so zerstörten die Lymphocyten die Implantatzellen in kurzer Zeit.

Einen weiteren sehr wichtigen Hinweis liefern ältere Feten des Schafes. Diese sind agammaglobulinämisch, und dieser Zustand bleibt bis nach der Geburt erhalten. Trotzdem sind sie befähigt, Hauthomoplantate zu zerstören (SCHINKEL und FERGUSON 1953). BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR (1954) gelang es, Immunität gegen ein Hauthomoplantat dadurch zu übertragen, daß sie regionale Lymphknoten immunisierter Tiere in isogene Wirte implantierten. So weisen die verschiedensten Beobachtungen und Experimente darauf hin, daß der Zerfall körperfremder Transplantate weniger durch freie Serumantikörper bewirkt wird als vielmehr durch zellgebundene Antikörper. Damit ergibt sich eine auffallende Parallele zur Tuberkulin-Allergie, worauf besonders von H. S. LAWRENCE (1959) hingewiesen wird.

Transplantation oder Injektion von Zellen eines Spenders, der sich in einem oder mehreren starken Gewebeverträglichkeitsgenen vom Wirt unterscheidet, führt also regelmäßig zu einer Immunisie-

rung des Wirtes gegen weitere Zellen dieses Spenders (SNELL 1957) Aus der experimentellen Embryologie ist jedoch seit langem bekannt, daß Homoplantate meistens und Heteroplantate nicht selten zu einer völlig normalen und überdauernden Zusammenarbeit mit den Geweben des Wirtes befähigt sind. Durch serologische Untersuchungen wies R.D.OWEN (1945) nach, daß die meisten dizygotischen Rinderzwillinge infolge synchorialer Gefäßanastomosen bei der Geburt Blutchimären sind. Allein auf Grund dieser Tatsache postulierten F.M.BURNET und F.FENNER (1949), daß durch den embryonalen Blutaustausch ein Zustand gegenseitiger Verträglichkeit entstehen muß, indem die immunologisch kompetenten Systeme durch den frühzeitigen Kontakt mit den Antigenen ihrer genetisch verschiedenen Partner spezifisch modifiziert werden, so wie dies normalerweise gegenüber autologen Gewebsantigenen geschieht.

Bereits 1951 und 1952 konnten MEDAWAR und Mitarbeiter zeigen, daß die dizygotischen Zwillingskälber gegenseitige Hauttransplantate ebensogut wie genetisch identische Zwillinge tolerieren, während sie Transplantate anderer Geschwistertiere wie solche gewöhnlicher homologer Partner in kurzer Zeit zerstören. In der Folge gelang es MEDAWAR und seinem Team, das Phänomen der erworbenen immunologischen Toleranz durch eine Reihe bewundernswerter Untersuchungen in seiner theoretischen und praktischen Bedeutung klarzulegen. Die Untersuchungen ergaben, daß antigenische Reize, die bei einem adulten Organismus sensibilisierend und Immunität auslösend wirken, bei embryonalen oder neugeborenen Wirtstieren Toleranz gegen diese Antigene induzieren. Beide Reaktionsphasen sind ontogenetisch durch eine Nullphase miteinander verbunden, die relativ zur Geburt recht verschieden liegen kann. Je länger und intensiver die antigenischen Reize einwirken und je jünger der Wirt ist, desto vollständiger wird die Toleranz. So ist es durch embryonale Parabiose gelungen, selbst zwischen Puten und Haushühnern dauerhafte Blutchimären zu erzeugen (HAŠEK, HRABA und HORT 1959).

Injiziert man immunologisch kompetente adulte Zellen wie Lymphocyten oder Milzzellen in einen Embryo, so bewirken sie in diesem zwar Toleranz, doch sie selber werden durch die Antigene des Wirtes sensibilisiert. Sie richten sich in der Folge gegen diesen,

schädigen vor allem dessen lymphatisches Gewebe und führen damit zu schweren Entwicklungshemmungen («Runt disease»), die nicht selten mit dem vorzeitigen Tod des Wirtes enden (BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR 1956, BILLINGHAM 1957, SIMONSEN 1957, MEDAWAR 1958). Entsprechende Krankheitssymptome treten auf, wenn lymphatische Zellen eines Elterntieres eines reinen Inzuchtstammes in ein F_1-Bastardtier dieses Stammes mit einem beliebigen andern injiziert werden. Das immunologisch kompetente Gewebe des Wirtes ist hier aus genetischen Gründen unfähig, gegen die injizierten Zellen zu reagieren, denn diese besitzen nur Gene, die der Wirt auch hat. Umgekehrt werden die fremden Zellen gegen alle Antigene des F_1-Wirtes sensibilisiert, die auf unterschiedliche Gene des anderen Elterntiers zurückzuführen sind (SIMONSEN und Mitarbeiter 1958). Ganz ähnlich verhält es sich, wenn ein mit letaler Dosis bestrahltes Tier adulte homologe oder heterologe lymphatische Zellen injiziert erhält: hier ist das immunologisch kompetente Gewebe des Wirtes durch die Bestrahlung ausgeschaltet (SIMONSEN und Mitarbeiter 1958). In bezug auf den Menschen ist an die fatalen Möglichkeiten zu denken, die ein Eindringen sensibilisierter mütterlicher Leukocyten in die Blutbahn der Feten mit sich bringen kann, oder an die Injektion totalbestrahlter Patienten mit blutbildenden Zellen.

Damit dürfte hinreichend gezeigt sein, daß Alter und genetische Verwandtschaft von Spender und Wirt von ausschlaggebender Bedeutung sind für den Erfolg oder Mißerfolg einer Zell- oder Gewebetransplantation. Feststellungen, die auf Experimenten mit Embryonen beruhen, dürfen daher nicht unbesehen auf den Austausch zwischen Adulten übertragen werden. Mit dieser Einschränkung sind die nun folgenden Ausführungen zu verstehen.

Verteilung und Entwicklung injizierter und implantierter homologer Zellen im embryonalen Wirt

In Untersuchungen von WEISS und ANDRES (1952) und ANDRES (1953) wurde das Verhalten embryonaler Zellen geprüft, die aus ihrem normalen Gewebeverband herausgelöst worden waren und durch die Blutbahn des Wirtes eine weite und zufällige Verbreitung erfahren hatten. Hierzu kamen vor allem solche Spenderzellen in Frage, die sich durch besondere Differenzierungsmerkmale später

eindeutig von den entsprechenden Zellen des Wirtes unterscheiden ließen. Als solche wurden Neuralleistenzellen dunkler Hühnerrassen (Braune Leghorn, Barred Plymouth Rock) gewählt, die später intensiv gefärbte Pigmentzellen liefern, während als Wirte 3–5 Tage alte Embryonen Weißer Leghorns dienten, deren Melanocyten in einem frühen Stadium der Entwicklung zugrunde gehen. In einigen weiteren Fällen dienten Embryonen Weißer Pekingenten als Wirt.

Die Zellsuspensionen wurden mechanisch durch Zerdrücken ganzer Embryonen oder von Teilen davon gewonnen; wiederholtes Durchsaugen durch feine Glaskapillaren ergab Dissoziation bis zu freien Einzelzellen und Zellgruppen (Abbildungen 59 b, c), die leicht reaggregieren. Von diesen in steriler Tyrodelösung aufgeschwemmten Zellen wurden pro Wirt etwa 2000 bis 5000 in dünne Venen des Dottersackes injiziert. Von da aus gelangten diese Zellen zum Herzen und durch die Arterien in alle embryonalen und extraembryonalen Bereiche. Auf ihrem Wege durch die feinen Kapillarnetze

---

Abbildung 59 a

Totalpräparat von Dottersackepithel nach Injektion von Chinesischer Tusche (Pfeil!) in eine Vene. Fein verteilte Tuschepartikel sind im gesamten Kapillarnetz des Dottersackes verteilt.

Abbildungen 59 b und c

Fixierte und gefärbte Ausstriche von Suspensionen dissoziierter Embryonalzellen, wie sie zur intravenösen Injektion in den Hühnerembryo verwendet wurden. Rechts in (c) eine Mitose (Telophase). Kerndurchmesser etwa 10 μ.

Abbildungen 59 d – h

Einzelne Melanocyten der Hühnerrassen, die im Experiment verwendet wurden:

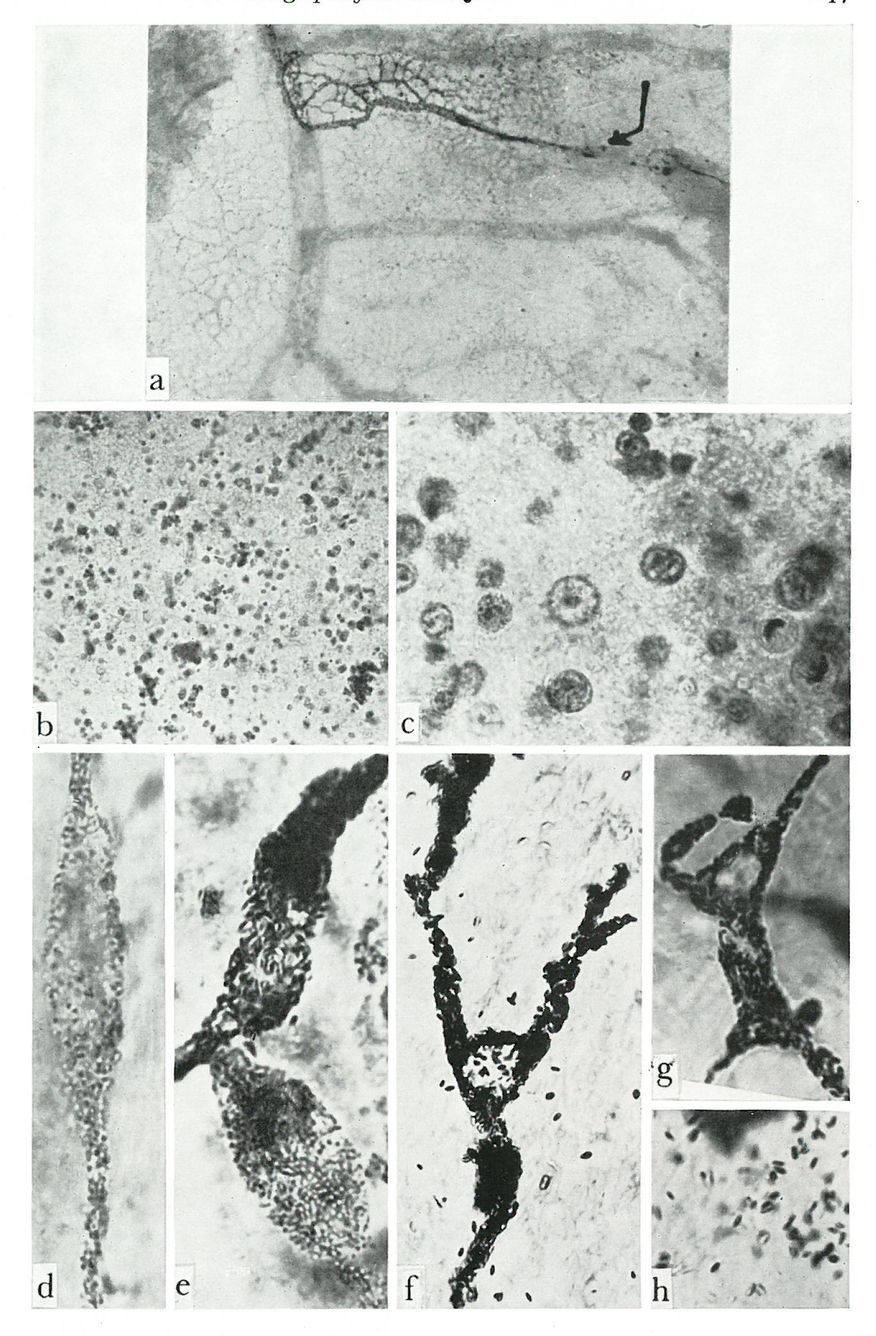
d) Melanocyt mit sphärischen Pigmentgranula aus einer Federanlage eines 13 Tage alten Weißen Leghorn-Embryos. 1125×.

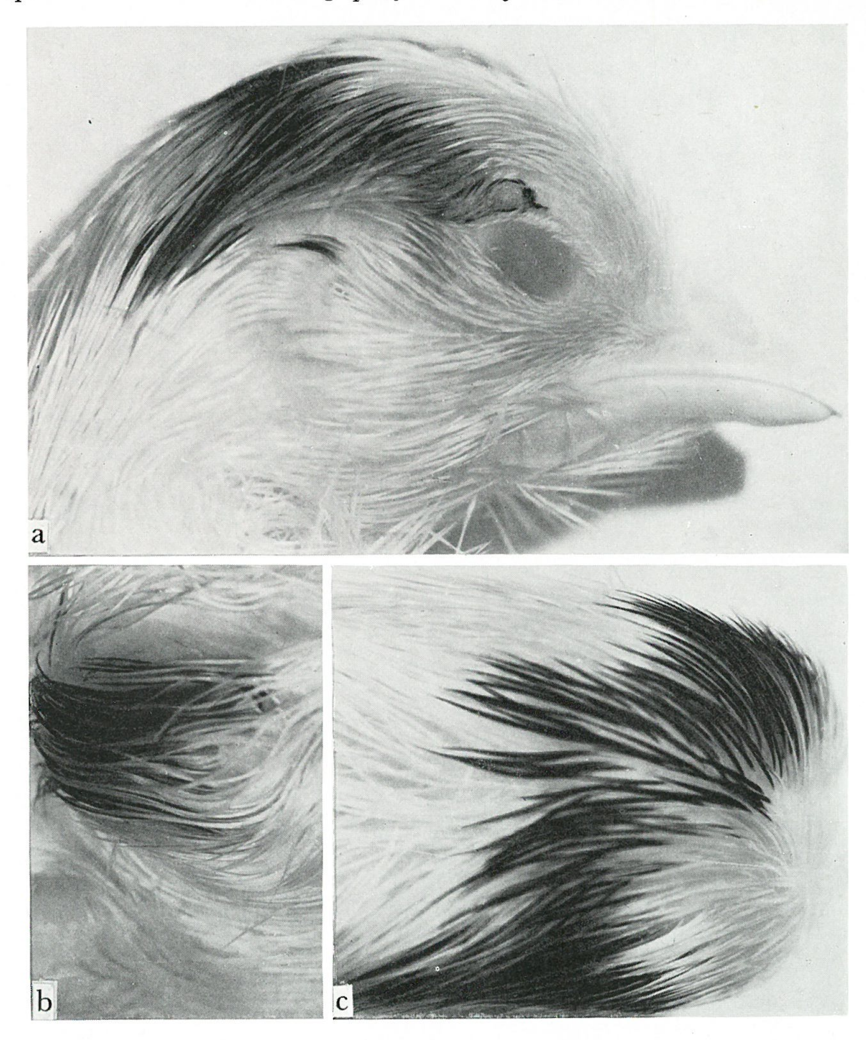
e) Oben dunkelbrauner Melanocyt mit länglichen Pigmentgranula, unten rötlicher Melanocyt mit sphärischen Granula, beide aus der Federanlage des Kopfes eines 13 Tage alten braunen Leghorn Embryos. 1400×.

f) Dunkler Melanocyt mit länglichen Pigmentgranula aus dem Peritoneum eines 16 Tage alten Barred Plymouth Rock-Embryos. 825×.

g) Melanocyt aus der Kopfhaut eines 12 Tage alten Barred Plymouth Rock-Embryos. 1125×.

h) Lose Granula von Melanocyten des Peritoneums eines 16 Tage alten Barred Plymouth Rock-Embryos. 1125×. (Aus Weiss und Andres 1952.)


a
b
c
d
e
f
g
h



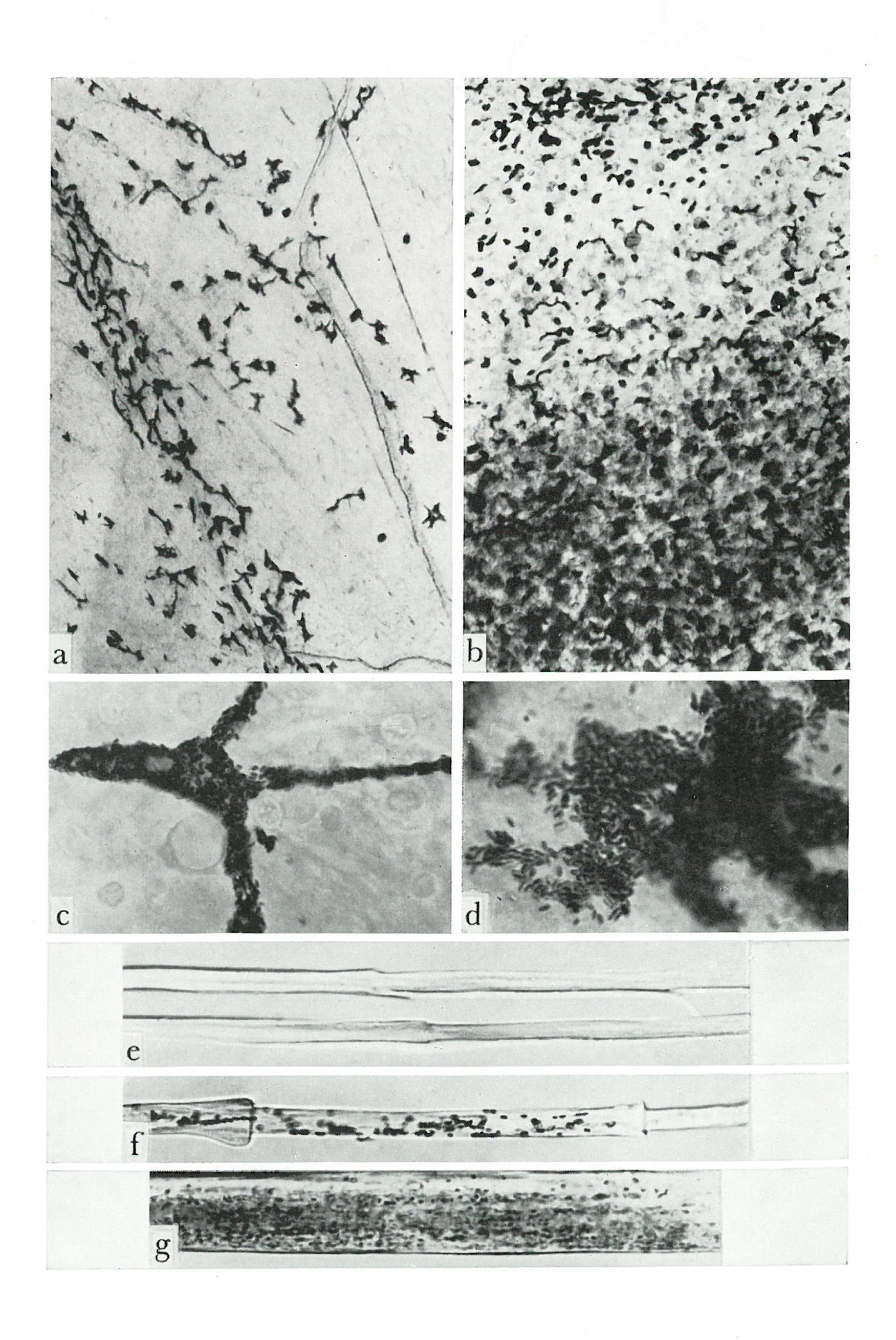
Abbildungen 60 a–c

Intravenöse Injektion von Propigmentzellen von zwei Tage alten Spendern dunkler Hühnerrassen (Barred Plymouth Rock und Braune Leghorn) in drei Tage alten Weißen Leghorn-Embryo. Umfangreiche Pigmentmetastasen in Kopf und Steiß. Küken kurz vor dem Schlüpfen. (Aus Weiss und Andres 1952.)

blieben immer wieder etliche der injizierten Zellen und Zellgruppen als Emboli stecken und verhinderten dort den weiteren Blutzufluß, was nach einigen Minuten zu Schwellungen im Bereich des Herzens und der großen Gefäße führte, weiter zu Arrhythmie und Herzflackern und schließlich zu größeren und kleineren Blutergüssen in die Gewebe des Embryos und ins extraembryonale Cölom (vergleiche Abbildung 59a). Von 593 mit präsumptiven Pigmentzellen intravenös injizierten Embryonen lebten 237 lange genug, um den Melanoblasten eine Chance zur Ausdifferenzierung zu geben. Bei 7% der Fälle wurden typisch spendergemäß differenzierte Melanocyten an Stellen gefunden, die weit vom Injektionsort entfernt waren (vergleiche Abbildungen 59d–h mit Abbildungen 60a–c und 61a–g). Dabei ist entscheidend, daß die Spendermelanocyten trotz ihrer Verfrachtung in alle Teile des Embryos und der extraembryonalen Bereiche nur in solchen Geweben gefunden wurden, in denen auch beim Spender Pigmentzellen vorkamen. In diesen Bereichen traten sie mitunter in einer Häufung auf (vergleiche Abbildungen 60 u. 61b), die stark kontrastiert zu der Kleinheit des Inoculums und zu der noch geringeren Zahl der zufällig in dieser Position metastasierten Zellen. Die wenigen Melanoblasten müssen in diesen für sie günstigen Orten einen sehr erheblichen Vermehrungs- und Differenzierungsanstoß erhalten haben, während umgekehrt die Hauptmenge der Melanoblasten, die durch Zufall in andere Körperteile geriet, durch den Wirt vollständig unterdrückt wurde.

Die Hauptmasse des injizierten Materials bestand nun nicht aus prospektiven Pigmentzellen, sondern aus Neuroblasten, Myoblasten, Chondroblasten, Osteoblasten, Nephroblasten usw. Von allen diesen Zellen war bei den intravenös injizierten Fällen im Embryo keine Spur zu entdecken. Möglicherweise nahmen diejenigen unter ihnen, die beim Austritt aus dem Gefäßsystem zufällig in ein passendes Milieu gerieten, analog den Pigmentzellen normal am Aufbau der Wirtsgewebe teil, während diejenigen, die zufällig in ein unpassendes gewebliches Milieu gerieten, unterdrückt wurden oder abwanderten.

Etwas anders als im Embryo verhielten sich die injizierten Zellen in den extraembryonalen Bereichen von Dottersack und Chorioallantois. Hier in einem geweblich neutraleren Milieu zeigten sie in etwa 8% der Fälle die Neigung, größere und kleinere Teratome von


a
b
c
d
e
f
g

charakteristischem histologischem Aufbau zu bilden (Abbildungen 62a und 63). Größere, verhältnismäßig hoch organisierte Teratome (Abbildungen 62b und 63) entstanden vermutlich aus einem Zellpfropf, der sich am Injektionsort bildete, während kleinere multiple Teratome echte Metastasen darstellen (Abbildung 62a).

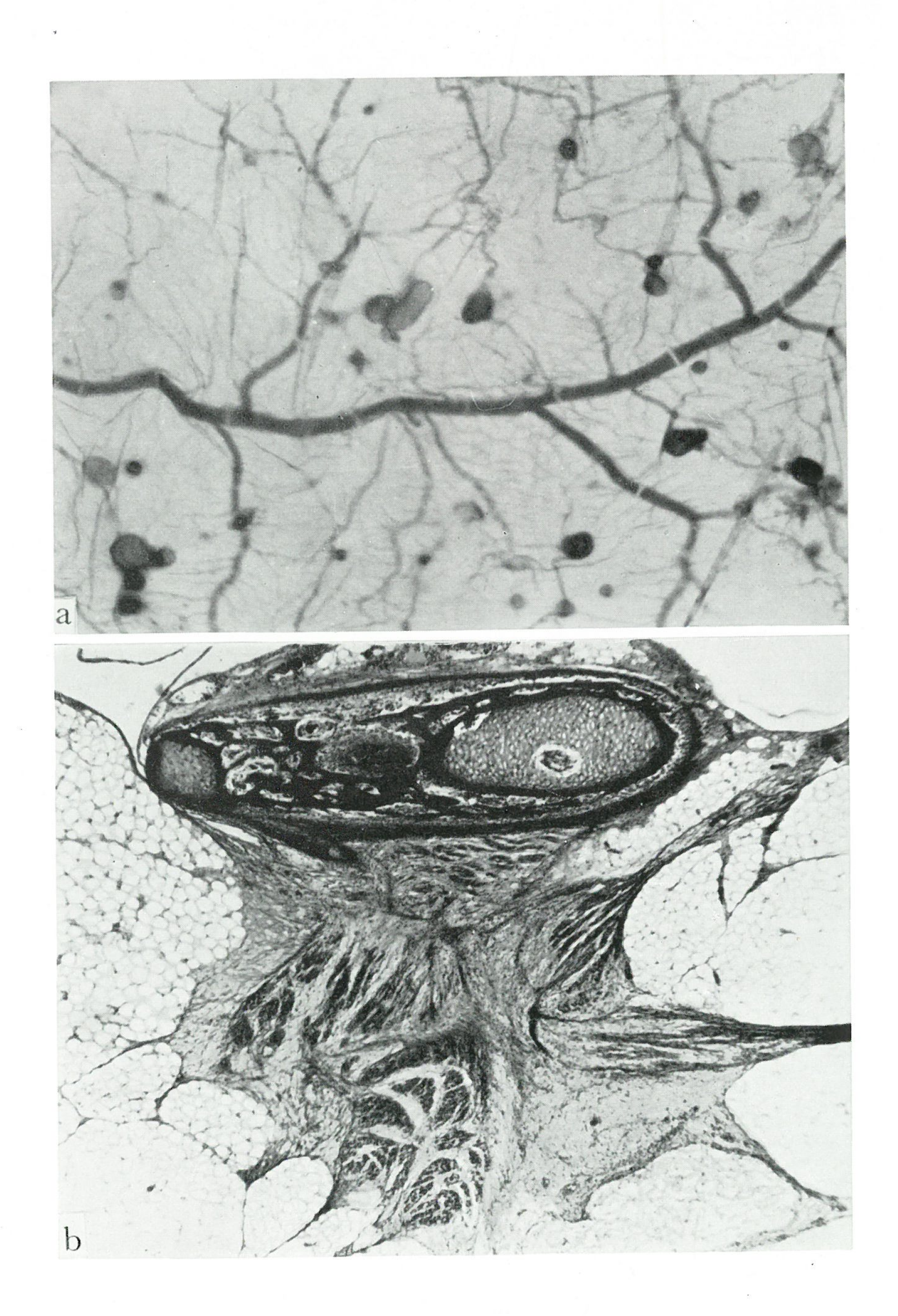
Wurden die Zellsuspensionen direkt subcutan in den Embryo injiziert, so kam es in 37 % der Fälle zu Pigmententwicklung im Embryo, aber nur in 2,7 % zur Ausbildung von Teratomen. Eine solche ist im Embryo vermutlich nur dann möglich, wenn ein größerer Zellpfropf direkt am Injektionsort steckenbleibt. Nur dann sind die injizierten Zellen in der Lage, sich gegenüber den viel stärkeren Entwicklungsfaktoren der umliegenden Wirtsgewebe zu behaupten und durchzusetzen. Daß diese Annahme zu Recht besteht, zeigen neuere in vitro Untersuchungen von Moscona (1956), wo bei heterotypischen Kombinationen dissoziierter embryonaler Zellen des Hühnchens die in Überzahl vorhandenen Zellen die schwächer vertretenen Zellen völlig in der Entwicklung unterdrückten. Wurde dieselbe kleine Zahl von Embryonalzellen für sich allein explantiert, so erfolgte normale Differenzierung.

In Fortsetzung dieser Untersuchungen explantierte Moscona (1957) Mischsuspensionen verschiedener Zellen von Hühner- und Mäuseembryonen, die sich von Anfang an cytologisch unterscheiden lassen. Bei isotypischen Kombinationen, zum Beispiel von chondrogenen Zellen, entstanden chimärische Differenzierungen, in denen Hühner- und Mäusezellen gemeinsam einen Gewebekomplex aufbauten. Bei heterotypischen Kombinationen sortierten sich dagegen die Zellen verschiedener geweblicher Herkunft voneinander, zum Beispiel Knorpelzellen der Maus von Mesonephroszellen des Hühnchens, wobei niemals eine Umdifferenzierung von einem Zelltypus zu einem anderen festzustellen war. In manchen heterotypischen Kombinationen kam es zu einer gewissen räumlichen

---

Abbildungen 61a–g

Gleiches Tier wie Abbildungen 60a–d, Melanocyten im Peritoneum, a) und b) 65, × c) 845 ×, d) 1125, × e) unpigmentierte Federstrahlen des Wirtes, 845 ×, f) Federstrahl mit länglichen Spendergranula, 845 × und g) Spitze eines Hauptstrahles mit sphärischen Spendergranula, 805 ×. (Aus Weiss und Andres 1952.)


a
b

Ordnung der differenzierten Gewebe im Aggregat, wie Lebergewebe peripher und Knorpel zentral, also ganz entsprechend wie in den oben erwähnten extraembryonalen Teratomen (Abbildung 63c). Auffallenderweise trat dies auch dann ein, wenn mit Zellen des Mäusemelanoms S91 kombiniert wurde. Erst in älteren Kulturen infiltrierten die Melanomzellen der Maus normales Knorpelgewebe des Hühnchens.

In diesem Zusammenhang verdient eine kurze Mitteilung von HUMPHREYS (1960) aus MOSCONAS Institut Beachtung. HUMPHREYS injizierte Suspensionen von Zellen des Ehrlichschen Mäuseascitestumors intravenös in Hühnerembryonen. Ein bis zwei Tage später wurden die meisten dieser Tumorzellen nicht mehr im Blut, sondern in verschiedenen Geweben des Embryos gefunden, wobei von Anfang an eine gewisse Präferenz der Besiedlung festzustellen war. Überall zeigten die Tumorzellen reichliche mitotische Vermehrung. Ungeachtet dessen nahmen sie zwischen dem 4. und 8. Tag nach der Injektion in allen Organen mit Ausnahme des Gehirns und des Dottersackes rapide ab, bis sie schließlich nur noch in diesen beiden Organen zu finden waren. Hier jedoch vermehrten sie sich intensiv weiter und bildeten bis zum Schlüpfen des Hühnchens makroskopisch sichtbare Tumorinseln. Da nur sehr wenig zerfallende Ascites-zellen gefunden wurden, besteht der Verdacht, daß die Tumorzellen aus den übrigen Geweben abwanderten und geeignetere Lokalitäten aufsuchten, ähnlich wie wir es nach Injektion normaler embryonaler Zellen in den Hühnerembryo vermuteten. Entsprechendes wird bei der Normalentwicklung für die Keimzellen der Vögel angenommen, deren Bildungsstätte außerhalb des Embryos und der Gonadenleisten liegt (SIMON 1958), und gilt generell für die

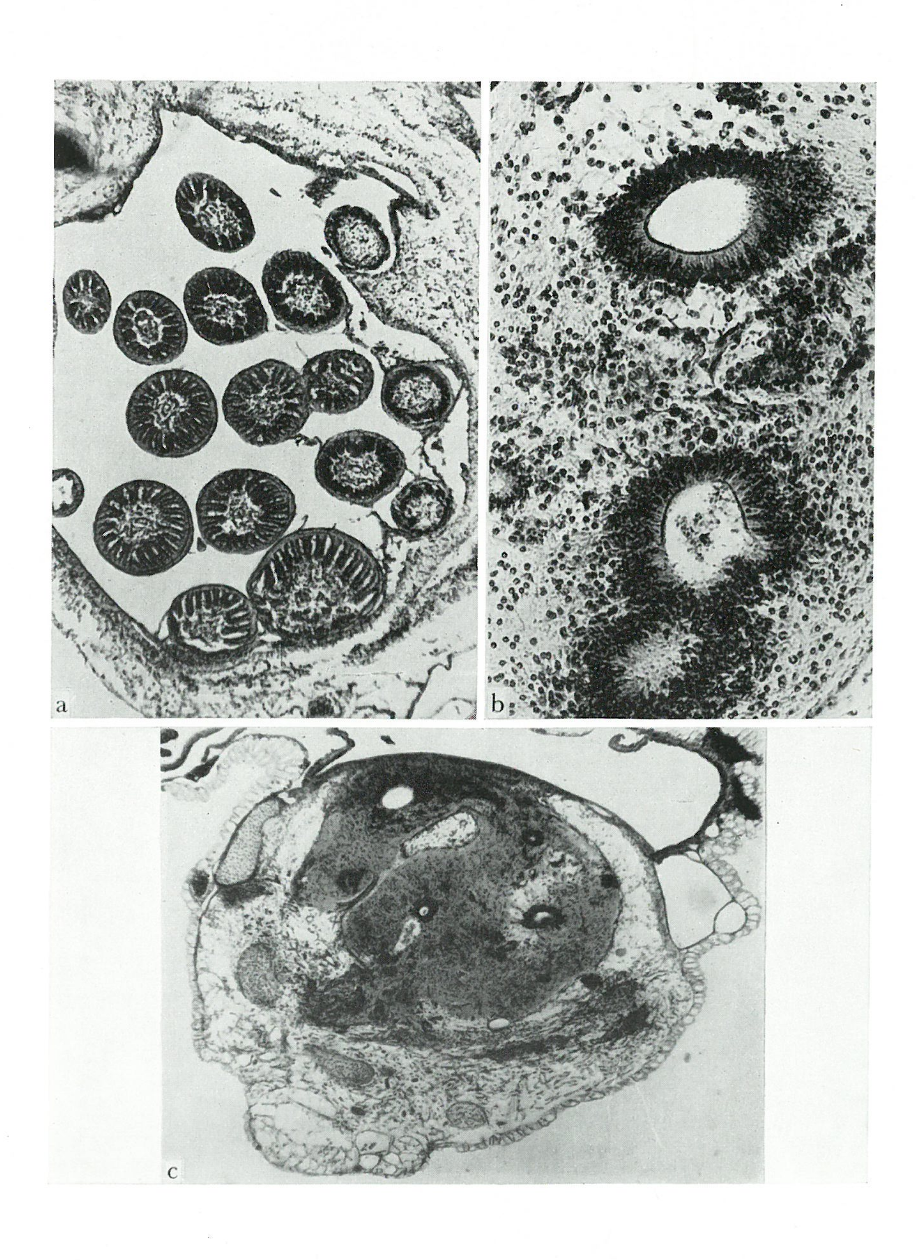
---

Abbildung 62 a

Nach Injektion dissoziierter Beinknospen: Teil des Dottersackepithels mit 35 Teratomen in den Verzweigungen der Kapillaren. Die meisten Teratome enthalten Knorpelteile.

Abbildung 62 b

Schnitt durch ein größeres Teratom mit einem wohlentwickelten Skelettstück mit Perichondrium, Knorpel, Diaphyse mit Knochen und Mark; außerdem Muskulatur, Bindegewebe und Fett. (Aus Andres 1953.)


a
b
c

auswandernden Neuralleistenzellen der Wirbeltiere (Hörstadius 1950).

Frühere Dissoziations- und Reaggregationsversuche an Amphibienembryonen (Townes und Holtfreter 1955) und an verschiedenen niederen Tieren (besonders Schwämmen und Coelenteraten) haben ebenso wie die eigenen (Andres 1953) und die Versuche Mosconas (1956, 1957, 1960) an Hühner- und Mäuseembryonen gezeigt, daß den dissoziierten Zellen eine bemerkenswerte Fähigkeit innewohnt, sich durch selektiven Zusammenschluß der gleichartigen Elemente wieder zu typischen Geweben und sogar zu organähnlichen Gebilden zu ordnen. In neuester Zeit führten Weiss und Taylor (1960) diese Untersuchungen weiter, indem sie Zellsuspensionen älterer, 8–14tägiger Hühnerembryonen herstellten und diese verhältnismäßig weit differenzierten Zellen nach Reaggregation auf der Chorioallantois von 8 Tage alten Hühnerembryonen auf ihr Selbstorganisationsvermögen prüften. Vor der gewöhnlichen in vitro Gewebekultur hat diese Methode den Vorteil, daß die Explantate vom Wirt reichlich vaskularisiert werden und sich demzufolge viel länger ungestört entwickeln und ausdifferenzieren können. Der Erfolg war entsprechend: Aggregate von Metanephroszellen entwickelten sich zu wohlgeformten kleinen Nieren mit corticalen Bowmanschen Kapseln und gewundenen Nierenkanälchen und darunter liegendem Nierenmark mit gestreckten Sammelkanälchen, die in ein zentrales Nierenbecken mündeten (Abbildungen 64a–c). Entsprechend gestalteten sich Leberzellaggregate zu typischem Lebergewebe mit Gallenkapillaren und größeren Gallengängen, reichlicher Blutversorgung und Hämatopoeseinseln (Abbildungen 65a, b).

Abbildung 63a

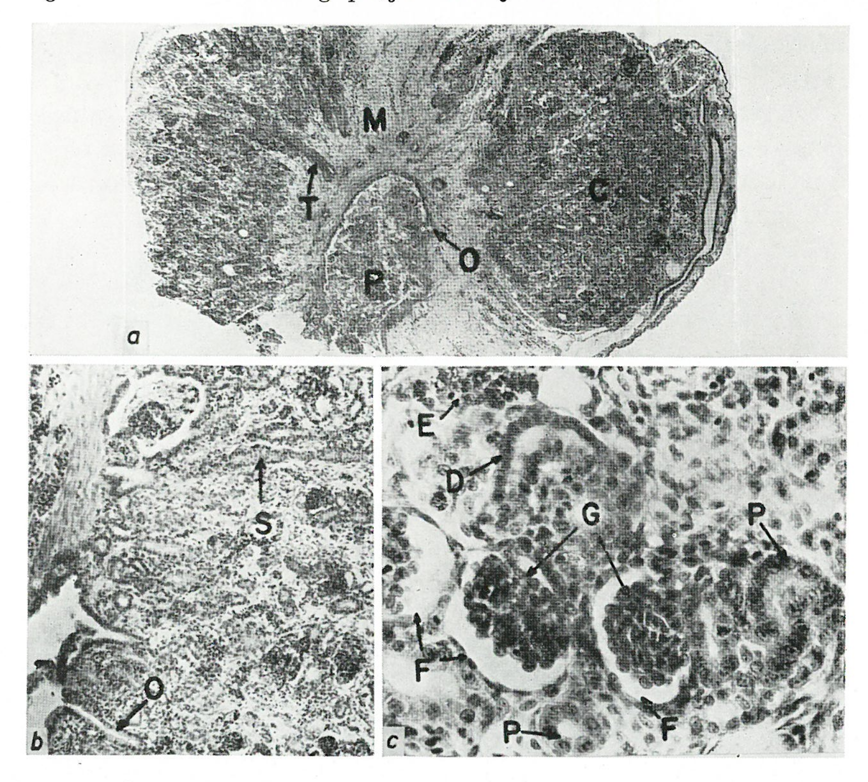
Schnitt durch große Epidermiscyste eines Teratoms mit 17 wohlentwickelten Federanlagen (im Querschnitt), 50 ×.

Abbildung 63b

Detailbild aus c) Nervengewebe mit Ependym, 223 ×.

Abbildung 63c

Großes Teratom im Epithel des Dottersackes. Große Masse von Nervengewebe mit Ependym und Nerven, die ins Mesenchym des Teratoms führen. Das Nervengewebe ist von etwas Muskulatur und von mehreren Knorpelstücken umgeben, 50 ×. (Aus Andres 1953.)



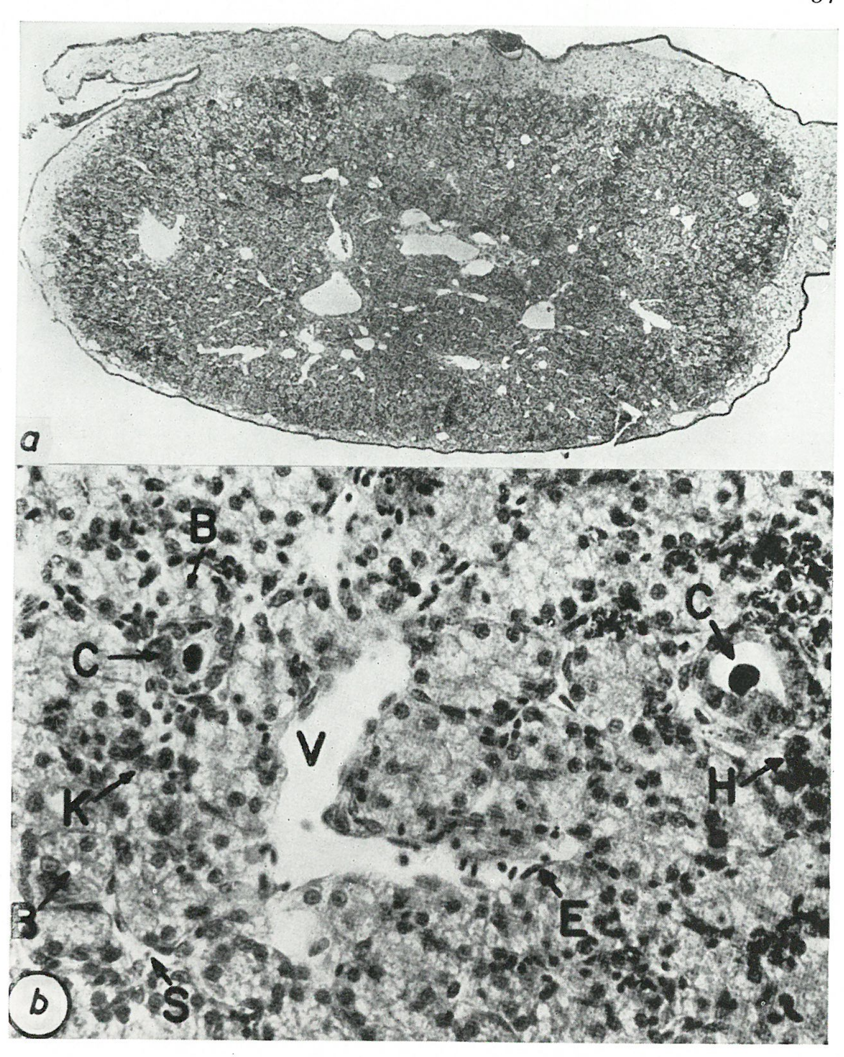
Abbildungen 64 a–c

Rekonstitution und Entwicklung einer weitgehend normal gestalteten Niere aus einem Aggregat freier Metanephroszellen neun Tage nach Explantation auf die Chorioallantois. (Aus Weiss und Taylor 1960; b und c sind Ausschnitte der Fig. 2 und 3 dieser Arbeit.)

a) Die Niere besitzt eine Rinde (Cortex, C) und ein Mark (M), in welchem Sammelkanäle (Tubuli, T) verlaufen und sich in ein zentrales Nierenbecken (Pelvis, P) öffnen (O). 38 ×.

b) Der Ausschnitt zeigt gestreckte Sammelkanäle (S im Nierenmark und die Öffnung (O) eines Nierenkanälchens in die Allantoishöhle des Wirtes. 103 ×.

c) Mehrere Malpighische Körperchen aus der selben Niere wie in b) mit Glomeruli (G), Trichter (F) des Sammelkanälchens, großzelligem Abschnitt des proximalen Teils des gewundenen Tubulus (P), kleinzelligem distalem Teil des gewundenen Tubulus (D) und einem Nest eosinophiler Leukocyten (E) 450 ×.



Abbildungen 65 a und b

Reorganisation einer Leber aus einem Aggregat von Leberzellen neun Tage nach Explantation auf die Chorioallantois, mit Gallenkapillaren (B) in einem Strang von Leberparenchymzellen, Canaliculi (C) mit Gallenkonkrementen, Kupfferschen Zellen (K), Hämatopoeseinseln (H), Venensinus (V), Sinusoid (S) und Endothelzellen (E) (aus Weiss und Taylor 1960).

Aggregate von Epidermiszellen bildeten Epidermisstücke, die sich zu Blasen schlossen und nach innen typische kleine Federn von einigen Millimetern Länge sproßten, deren Ausbildungsgrad ganz dem entsprach, den wir bei den Federanlagen der komplex zusammengesetzten Teratome aus jüngeren Embryonalzellen fanden (Abbildung 63a).

Auf die einzelnen Entwicklungsschritte, die für das Zustandekommen so komplexer und hochorganisierter Gebilde aus einem Haufen willkürlich zusammengeschütteter Zellen notwendig sind, soll hier nicht eingegangen werden, doch sei betont, daß induktive Hilfe von außen hier nicht in Frage kommt. Andernfalls müßte man annehmen, daß das Gewebe der Chorioallantois einmal als Niereninduktor, dann als Leberinduktor und schließlich als Induktor und Organisator typischer Hautstrukturen fungierte. Die Information zu den einzelnen Leistungen liegt also ganz in den jeweils explantierten Zellen. Damit weisen die Versuche hin auf die zentrale Bedeutung innerer «Selbstorganisation» gegenüber den lange Zeit im Vordergrund des Interesses gestandenen Induktionsvorgängen. Für den selektiven Zusammenschluß gleichartiger Zellen zu Geweben und der Gewebe zu Organen oder organoiden Strukturen kommen außer der Fähigkeit der embryonalen oder «entdifferenzierten» Zellen zu amöboider Bewegung die den Zellen inhärente polare Organisation und eine vermutlich stereochemisch bedingte spezifische Oberflächenstruktur (P. WEISS 1950) der einzelnen Zellsorten in Frage (Zell- oder Gewebeaffinitäten nach HOLTFRETER 1939), Eigenschaften, die nicht nur für die normale Entwicklung und Erhaltung der tierischen Organisation von größter Bedeutung sind, sondern auch für die Vorgänge der Regeneration, Reparation und Wundheilung.

Spezifische Wachstumsreaktionen des Wirtes auf ein Inoculat

Seit den Untersuchungen von DANCHAKOFF (1916), MURPHY (1916), WILLIER (1924), WEISS und WANG (1941), EBERT (1954) und neuerdings von NEUMANN (1959) wissen wir, daß Gewebeimplantate auf der Chorioallantois des Hühnchens spezifische Wachstumsreaktionen der homologen Organe des Wirtes auslösen können. Die eingangs besprochenen immunologischen Reaktionen, besonders nach Im-

plantation adulter Gewebe, mahnen jedoch zur Vorsicht bei der Beurteilung der jeweiligen Befunde. Frühere eigene Versuche (ANDRES 1955) hatten die Wirkung von intravenös injizierten Zellsuspensionen embryonaler Niere und Leber auf die homologen Organe 6 Tage alter Weißer Leghornembryonen als Untersuchungsziel. Die Zellsuspensionen bestanden entweder aus lebendfrischen Zellen, oder sie stammten von Organen, die durch Gefrieren und Auftauen devitalisiert worden waren. Im Gegensatz zu anderen Autoren bestimmten wir nicht die Gewichte der interessierenden Organe, sondern deren Mitoseindices, die ein genaueres Bild vom Ablauf der spezifischen Wachstumsreaktionen versprachen (vergleiche HAMBURGER 1948, HAMBURGER und LEVI-MONTALCINI 1949 und OVERTON 1950 und 1955). Bei der Urniere waren die Mitoseindices bereits 6 Stunden nach der Injektion homologer Zellen durchschnittlich um 32 % höher als bei den Kontrollen. Der Unterschied erhöhte sich nach 12 Stunden auf 54 % und nach einem Tag auf 59 %. Nach zwei Tagen lag er immer noch um 41 % über den Kontrollen. Der durchschnittliche Unterschied von 43 % erwies sich statistisch als sehr gut gesichert. Das Gefrieren und Auftauen setzte die Wirksamkeit der Suspensionen nicht herab, eher verstärkte es sie, was sich gut deckt mit dem Ergebnis von Frisch- und Siccacellimplantaten von Milz auf die Chorioallantois des Hühnchens (NEUMANN 1959). Die Injektion von Mesonephroszellen hatte aber auch einen positiven Effekt auf die Proliferation der Leber, doch trat dieser um einen Tag verspätet ein und erreichte mit 23 % nur gut die Hälfte der Zunahme bei der Niere.

Injektion von Leberzellsuspensionen hatte auf die Leber der Wirtstiere nur nach 6 und 12 Stunden eine fördernde Wirkung; nach einem Tag war sie verschwunden, und nach zwei Tagen lagen die Mitoseindices der Versuchstiere sogar unter denen der Kontrollen. Die im Durchschnitt leicht fördernde Wirkung auf die Leber kontrastiert zu der leicht hemmenden auf die Urniere. Um die Spezifität der Injektionswirkungen besser fassen zu können, wurden die Verhältnisse der Mitosenhäufigkeiten Leber : Mesonephros für jeden einzelnen Fall berechnet. Die Durchschnittswerte ergaben deutlich eine Förderung des jeweils homologen Organs, die nach 12 Stunden mit einem Unterschied von 50 % am ausgeprägtesten war. Der Gesamtunterschied von 29 % erwies sich als statistisch sehr gut gesi-

chert. Die damit aufgezeigte Spezifität der Wirkung ist wohl das Hauptergebnis dieser Versuche (Abbildung 66).

Entsprechendes geht auch aus den Versuchen von Ebert (1954) hervor. Ebert implantierte mit S^{35} (Methionin) markierte Hühnermilz, ferner Leber und Niere und als Kontrolle Mäusemilz auf die Chorioallantois des Hühnerembryos und bestimmte nach 3 oder 5

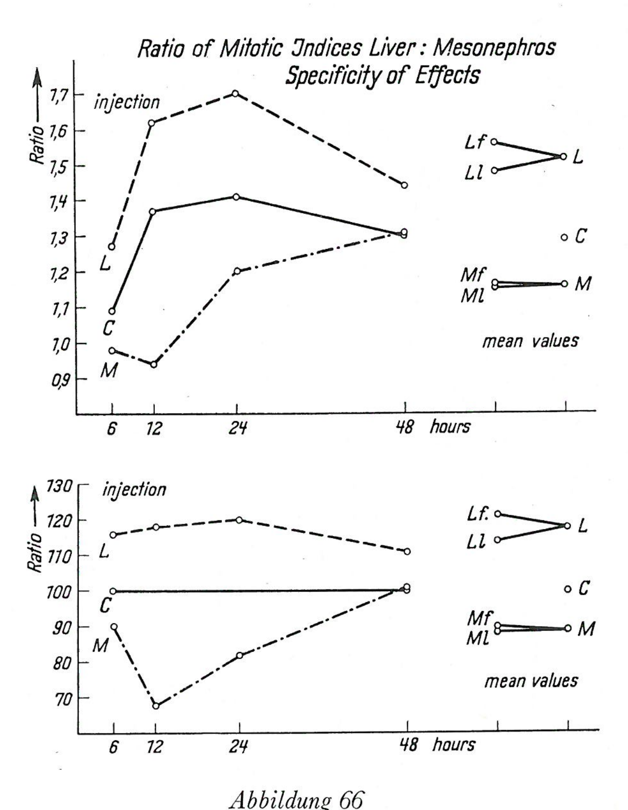


Abbildung 66

Verhältnisse der Mitoseindices von Leber: Mesonephros bei Kontrollen (C), leberinjizierten (L) und mesonephrosinjizierten (M) Embryonen. Oben: Absolute Werte, unten: Vergleichswerte der Kontrollen jeweils als 100% gesetzt. Die Injektionen bewirken eine jeweilige Verschiebung der Kurven zugunsten des homologen Organs. Differenz der Gesamtwerte der Experimentalserien statistisch hoch gesichert, dadurch Spezifität der Wirkung bewiesen. Mf, Lf = gefrorenes (devitalisiertes) Material injiziert. Ml, Ll = lebende Zellen injiziert.
(Aus Andres 1955.)

Tagen das Verhältnis der Radioaktivität der Proteine des Spendergewebes zu derjenigen des Wirtsgewebes. Dabei ergab sich nach Verwendung von Hühnergewebe ein hochgradig selektiver Übertritt der Radioaktivität vom Implantat zum homologen Wirtsgewebe. Bei Verwendung von radioaktiver Mäusemilz war dagegen keine solche Selektivität festzustellen. Im ersten Fall enthielten nach drei Tagen bis zu 15% der Proteine des homologen Wirtsgewebes spezifische molekulare Anteile der Proteine des Transplantats, was nach EBERT dafür spricht, daß spezifische Komponenten des Transplantats, die höher molekular sind als Aminosäuren, sich am Aufbau der Wirtsproteine beteiligten. Die Versuche schließen aber nicht aus, daß die homologen Organe, speziell die Milz, direkt von Zellen des Transplantats besiedelt wurden. Die eingangs erwähnten immunologischen Experimente (Splenomegalie nach Injektion adulter Milzzellen in den Hühnerembryo, SIMONSEN 1957) sprechen für diese Möglichkeit. Die Beobachtung NEUMANNS (1959), daß durch Gefrieren und Wiederauftauen devitalisierte Milzstückchen ebenso wie Milz-Siccazellen nach Implantation in die Chorioallantois die Entwicklung und Differenzierung der Milz der Versuchstiere positiv beeinflussen, läßt sich dagegen zur Unterstützung der Ebertschen Auffassung anführen.

BUEKER (1948) transplantierte Stückchen von Sarkom 180 der Maus in die Körperwand von drei Tage alten Hühnerembryonen. Die Tumoren wuchsen hier stark heran und induzierten im Wirt eine auffallende Vergrößerung der Spinal- und Sympathicusganglien und eine enorme Hypertrophie der sensorischen, aber keine der motorischen Nerven. Die Experimente wurden von LEVI-MONTALCINI und HAMBURGER (1951, 1953) und von LEVI-MONTALCINI (1952) weitergeführt. Es zeigte sich, daß auch Transplantate auf der Chorioallantois, also ohne direkten Kontakt mit dem Nervengewebe des Embryos, dieselbe Wirkung hatten, wobei es zu einer ungewöhnlichen Invasion visceraler Nerven in Organe kam, die normalerweise kaum innerviert sind (Abbildung 67), und selbst Durchbrüche von Nervenknäueln in das Lumen von Blutgefäßen wurden beobachtet. Es dürfte sich hier wohl um einen der stärksten morphogenetischen Effekte handeln, die bisher bei Heterotransplantaten gefunden wurden. Weitere Untersuchungen ergaben, daß da Nervengewebes durch Proteine des Tumors direkt beeinflußt wird und daß gewisse

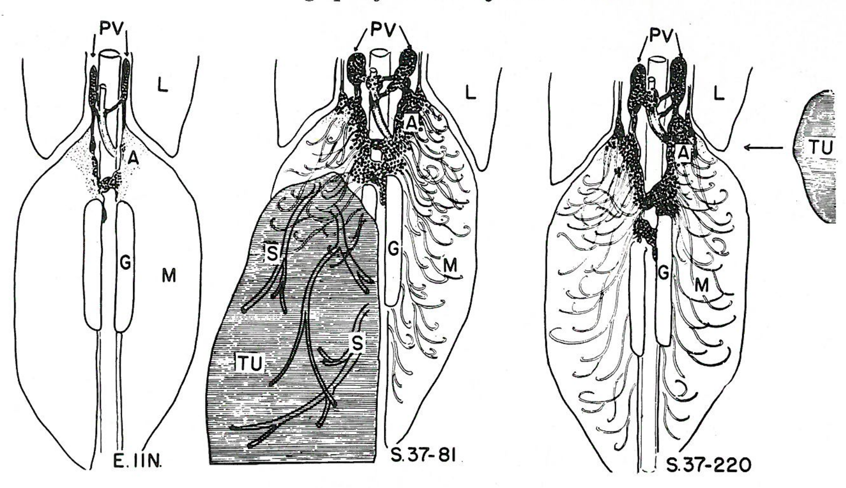


Abbildung 67

Wirkung von Tumortransplantaten auf das Wachstum der prävertebralen Ganglien des Hühnerembryos. E 11N: Normaler, elf Tage alter Embryo, S 37–81: elf Tage alter Embryo mit intraembryonalem Transplantat von Mäusesarkom, S 37 – 220: elf Tage alter Embryo mit Implantat von Sarkom 37 in der Chorioallantois. Bei den Versuchstieren erfolgte eine starke Hyperplasie der prävertebralen Ganglien, deren Nerven die in der Nähe gelegenen, normalerweise kaum innervierten Mesonephroi durchziehen. A = Nebenniere, G = Gonade, L = Lunge, M = Mesonephros, PV = prävertebrale Ganglien, S = sensorische Nerven (aus Levi-Montalcini 1952).

Schlangengifte dieselbe Wirkung besitzen (Levi-Montalcini, Meyer und Hamburger 1954, Cohen, Levi-Montalcini 1956, 1957, Levi-Montalcini 1957).

In diesem Zusammenhang verdient noch eine neuere Beobachtung von A. Moscona (1960) besondere Erwähnung: Zellen von frisch dissoziierter embryonaler Mäusehaut reaggregieren in vitro ohne weiteres und bilden ausgedehnte Verbände dermaler Zellen, denen sich Epidermis und Haarknospen auflagern. Auf koaguliertes Plasma übertragen, entwickeln sich solche Aggregate in Hautstücke mit Haaranlagen. Werden die dissoziierten Hautzellen jedoch einschichtig in Eagles Kulturmedium mit 10% Pferdeserum und 2% Hühnerembryoextrakt kultiviert, so verlieren sie allmählich ihre Fähigkeit zu reaggregieren. Nach 10 Tagen können sie in rotierenden Flaschen noch zum Zusammenballen gebracht werden, doch

bleiben die einzelnen so erhaltenen Aggregate auffallend klein. Gleichzeitig nimmt die histogenetische Leistung ab, indem nur noch verstreut konzentrische Zellgruppen und Keratinfragmente entstehen. Verweilen die Hautzellen noch länger in der einschichtigen Kultur, so entstehen nach Übertragung in den Schüttelflaschen noch kleinere Aggregate, die keine identifizierbare innere Struktur mehr zeigen. Werden solche Aggregate auf koaguliertes Plasma gebracht, so bilden sie epitheliale Auswachszonen und fibrocytäre Zellen. Gleiches geschieht, wenn die Zellen durch Zentrifugieren aggregiert und anschließend auf Plasma explantiert werden: die aufgezwungene Zusammenballung gibt den modifizierten Zellen die Fähigkeit zur Histogenese nicht wieder.

In weiteren Versuchen wurden die modifizierten Hautzellen in hetero- und isotypischen Kombinationen mit frisch dissoziierten embryonalen Hühner- oder Mäusezellen vereinigt. Geschah dies heterotypisch mit Vorknorpelzellen, so erlangten die modifizierten Hautzellen keine ihrer ursprünglichen histogenetischen Fähigkeiten und Gruppierungspräferenzen wieder. Wurden sie aber isotypisch mit Zellen embryonaler Hühnerhaut zusammengebracht, so erhielten sie ihre ursprüngliche histogenetische Fähigkeit zurück: sie ordneten sich zu typischen Geweben und bildeten follikelartige Strukturen, die häufig chimärisch zusammengesetzt waren.

Aus zahlreichen älteren und neueren Arbeiten geht hervor, daß ein Entfernen des einen Partners eines paarigen Organs zu einer kompensatorischen Vergrößerung des verbleibenden Partners führt. Dieser Befund steht in einem gewissen logischen Gegensatz zu den Experimenten, bei denen Zugabe von Organstücken oder Zellinjektionen denselben Effekt besitzen. Eine von P. Weiss 1955 ausführlich dargelegte und begründete Hypothese ist geeignet, diesen Widerspruch zu überbrücken: Jeder Zelltypus ist danach charakterisiert durch spezifische Schlüsselverbindungen (key compounds, templates oder Matrizen), die beim Wachstum eine entscheidende Rolle spielen. Während diese Schlüsselverbindungen die Zelle unter normalen Bedingungen nicht verlassen, werden andere ebenfalls spezifische Komponenten gebildet, die aber die Möglichkeit haben, frei aus und in die Zellen zu diffundieren. Diese von Weiss als «antitemplates» bezeichneten Verbindungen sollen befähigt sein, durch ihre sterischen Beziehungen nach immunologischem Muster die

Wirksamkeit der Schlüsselverbindungen innerhalb der Zellen zu blockieren. Wächst ein Organ relativ zum Körper stark heran, dann bringt dies eine erhebliche Vermehrung der spezifischen Komponenten mit sich. Die Konzentration der «anti-templates» im Blut wächst und damit auch ihre Rückdiffusion in die Zellen, deren weiteres Wachstum dadurch abgebremst wird. Entfernt man nun einen Teil des betreffenden Organs experimentell, so führt dies infolge des verringerten Nachschubes an diffusiblen Komponenten bei gleichbleibender Zerfallsrate der vorhandenen zu deren Verarmung im Blut und damit auch in den restlichen Zellen des verkleinerten Organs. Der Erfolg ist kompensatorisches Wachstum, bis das Gleichgewicht wieder eingespielt ist. Bei Injektion von Organbrei oder bei Transplantation adulter Gewebe auf die Chorioallantois dürfte wohl stets ein beträchtlicher Zellzerfall dazu führen, daß auch ein Teil der sonst nicht diffusiblen spezifischen Komponenten frei wird und ins Blut gelangt, dort entweder mit den diffusiblen Komponenten reagiert oder auch von den homologen Zellen direkt aufgenommen wird, woraus in jedem Fall wieder ein Wachstumsanstoß resultiert.

Spezifische Einwirkungen auf den Phänotypus des Wirtes durch transplantiertes Gewebe

Nach dem Dargelegten ist nicht zu zweifeln, daß zwischen Transplantat und Wirt sich hochspezifische Wechselwirkungen abspielen. Es stellt sich nun die Frage: In welchem Grade ist es möglich, durch implantierte Zellen eines bestimmten Genotypus in einem Wirtsorganismus von abweichender genetischer Konstitution eine Änderung oder Korrektur dessen Phänotypus im Sinne des Transplantats herbeizuführen?

Auf Grund ihrer Versuche an gefärbten und weißen Entenrassen (Khaki Campbell und Weiße Peking) vertreten Benoit und Mitarbeiter (1956–1960) die Auffassung, daß durch Injektion von DNS der einen Rasse eine spezifische Veränderung nicht nur des Phänotypus der anderen Rasse im Sinne der Injektion möglich sei, sondern auch eine solche des Genotypus (nach dem Muster der Transduktion genetischer Substanz bei Mikroorganismen). Nach dieser Interpretation könnten die eingangs erwähnten Befunde von Weiss und Andres (l.c.) also auch so gedeutet werden, daß durch Zerstörung von Zellen freigewordene genetische Substanz der pigmentier-

ten Spenderrassen in präsumptive Pigmentzellen des Wirtes eingebaut wurde und so das Auftreten der dunklen Gefiederpartien (Abbildung 60) bewirkte. Auf der Basis des vorhandenen Materials läßt sich die Frage nicht eindeutig entscheiden, doch spricht das häufige Vorkommen dunkler Pigmentzellen in den extraembryonalen Teratomen eher gegen eine solche Deutung.

Die Möglichkeit einer positiven Beeinflussung erbbedingter Entwicklungsstörungen wird von HADORN (1955) grundsätzlich bejaht. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß eine Erbanomalie im einen Fall durch innerzellige Genwirkung, also autophänisch bedingt sein kann, während in anderen Fällen zwischenzellige, allophänische Genwirkungen vorliegen. Die Verhältnisse sind in Abbildung 68 (Abbildung 97 aus HADORN 1955) veranschaulicht. Dargestellt sind drei Zellen (I, II, III) aus drei verschiedenen Organsystemen einer Insektenlarve. In jeder der drei Zellen sind 10 Genloci (1–10) eingetragen, von denen jeder einen locusspezifischen biochemischen

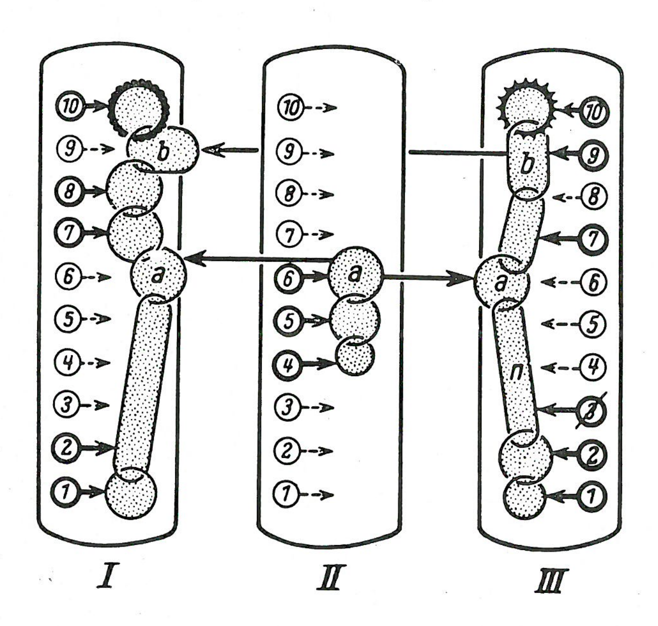


Abbildung 68

Schema der genphysiologischen Grundlagen der Differenzierung und Merkmalsbildung in drei verschiedenen Zellsystemen (I–III) eines Organismus. Erläuterungen im Text (aus Hadorn 1955).

Prozeß steuert (im Schema durch Pfeile angedeutet). Für die zu betrachtenden Vorgänge ist aber nur ein Teil dieser Loci notwendig (im Schema dick umrahmt). Durch sie würde nun je ein Glied einer Wirkstoffkette bedingt, die zu einer bestimmten Merkmalsbildung führt (bei I und III am Ende der Kette). Die Ketten selber enthalten sowohl autophänische als auch allophänische Glieder (in I sind a und b, in III ist a allophänisch bedingt). Eine Mutation im Locus 3 verursacht nun im System III den Ausfall des Gliedes n und damit eine Unterbrechung der Wirkkette III; das Schädigungsmuster wäre in diesem Fall autophänisch. Durch die Mutation fällt aber auch die Bildung des Kettengliedes b in III aus, was wiederum den letzten Schritt zur Merkmalsbildung in I verhindert. Die in I auftretende Schädigung ist primär zellextern bedingt und daher als Allophän zu bezeichnen. Wird nun in einem Transplantationsexperiment das Zellsystem I aus einem Spender, bei dem der Locus 3 zu einem Letalfaktor mutiert ist, rechtzeitig in einen genetisch normalen Wirt implantiert, so können die zellexternen Kettenglieder a und b auf die implantierten Zellen einwirken und deren vollständige und normale Entwicklung ermöglichen. HADORN bezeichnet eine solche Wirtshilfe als «nicht-locus-spezifisch». Der Terminus deutet darauf hin, «daß die vom Wirt gelieferten Stoffe dem Implantat nicht ein Agens ersetzen, das seinem Zellsystem infolge einer vorhandenen Mutation fehlt». Es wurden ihm durch den Wirt lediglich zellexterne Stoffe zugeführt, die auch das nichtmutierte Zellsystem des Typus I von außen beziehen muß. Eine «locusspezifische» Wirtshilfe wäre erst dann gegeben, wenn ein genbedingter Wirkstoff des Wirtes (in unserem Falle 3^+) in die Merkmalsbildung der Implantatszellen eingriffe, «und zwar an einer Stelle, die in der normalen Phänogenese durch ein zellinternes Kettenglied besetzt ist. Ersetzt würde ein Stoff, der in den Implantatszellen deshalb nicht entstehen kann, weil die Mutation einen für dieses Zellsystem unentbehrlichen Locus betroffen hat.» Allgemein dürften im Transplantationsversuch die Voraussetzungen für eine nicht-locus-spezifische Hilfeleistung seitens der Zellen des normalen Partners viel häufiger und leichter erfüllt sein als für eine locus-spezifische. Ein gut untersuchtes Beispiel geben uns bestimmte Genwirkungen, welche die Bildung von Augen- und Körperpigmenten bei Insekten bedingen (KÜHN 1961).

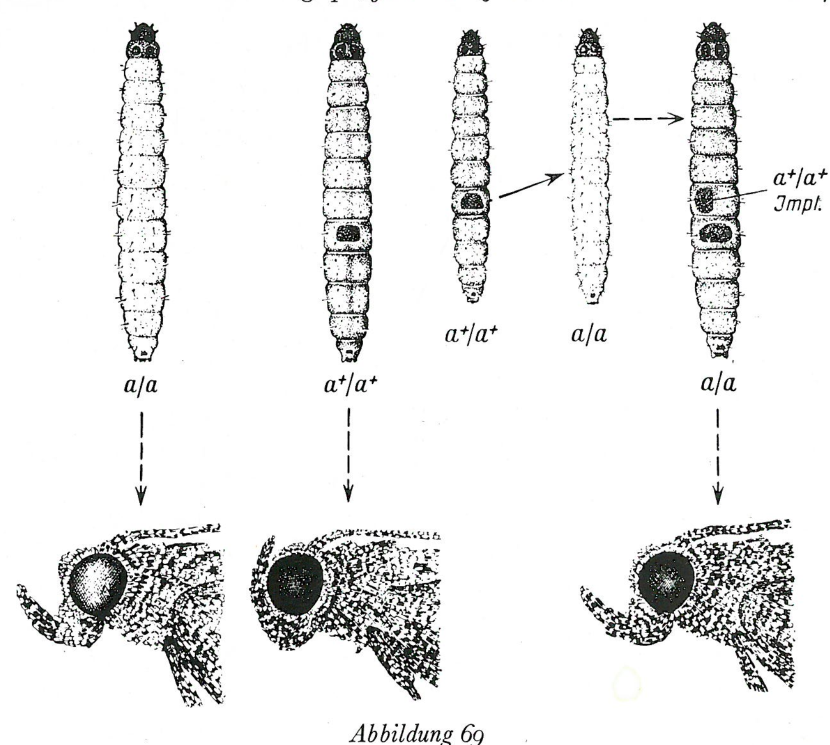


Abbildung 69
Wirkung von Hodentransplantaten der Wildform (a^+/a^+) von Ephestia kühniella auf Raupenfarbe, Hodenfarbe und Farbe der Falteraugen der Mutante a/a (aus Kühn 1961).

Bei der Mehlmotte (Ephestia kühniella) sind die Augen der Wildform schwarzbraun, die Raupenhaut ist rötlich und gewisse innere Organe wie Nervensystem und Hoden sind dunkelgefärbt (Abbildung 69). Bei der Mutante a färben sich die Augen durch Ausfall bestimmter in der Wildform vorhandener Pigmente rot, während die Larvenhaut und die inneren Organe unpigmentiert bleiben. Transplantiert man nun pigmentierte Organe der Wildform in Raupen oder junge Puppen der Mutante, so färben sich die Augen des Wirtes dunkel; implantiert man im vorletzten Raupenstadium, so färben sich auch die Raupenorgane des letzten Stadiums (Abbildung 69). Im gleichen Sinne wirken Extrakte aus Puppen der Wildform, die man in Puppen der Mutante injiziert. Das a^+-Produkt

wurde als Kynurenin identifiziert. Es entsteht unter der Wirkung des Gens a^+ aus Tryptophan (Abbildung 71). Injiziert man Kynurenin in a-Puppen, so ersetzt es die a^+-Wirkung. Entsprechendes gilt für die helläugige Mutante vermilion (v) bei Drosophila. Durch die Mutation fällt die Bildung des Ferments aus, das die Umsetzung von Tryptophan in Kynurenin steuert. Ganz entsprechend bewirkt das Gen cn^+ bei Drosophila die weitere Umsetzung von Kynurenin in 3-Hydroxykynurenin (Abbildung 71). Die schließliche Oxydation der löslichen Vorstufen zu den pigmentierten Ommochromen geschieht an bestimmten Eiweißträgergranula (Abbildungen 70 und 71). Bei der Mutation wa (weißäugig) von Ephestia fehlen diese, während die diffusiblen Pigmentvorstufen normal gebildet werden. Transplantiert man nun Augen von wa-Puppen in a-Puppen, so liefern sie dem Wirt die diffusiblen Pigmentvorstufen, und dessen Augen färben sich aus; sie selber bleiben aber weiß, da ihnen die Eiweißgranula fehlen. Deren Ausfall ist demnach autophänisch bedingt und durch den Kontakt mit Normalgewebe nicht zu beheben.

Auch beim hypophysären Zwergwuchs der Maus (SNELL 1929; GRÜNEBERG 1952; HADORN 1955) lassen sich autophänische und allophänische Genwirkungen klar voneinander trennen. Ein rezessiver Faktor (dwarf, dw) bewirkt, daß die homozygoten Tiere in der Entwicklung zurückbleiben (n_1 und dw_1 in Abbildung 72), wobei vor allem auch die Sexualentwicklung stark gehemmt ist. Die autophänische Genwirkung ist auf den Hypophysenvorderlappen beschränkt. Dieser bleibt sehr klein (n_2 und dw_2 in Abbildung 72), und auf späteren Stadien fehlen ihm die großen charakteristischen acidophilen Zellen, von denen man annimmt, daß sie das Wachstumshormon bilden (n_3 und dw_3 in Abbildung 72). In der Entwicklung der Mutante scheinen diese für die Normalfunktion unentbehrlichen Zellzustände übersprungen zu werden (n_4 und dw_4 in Abbildung 72). Durch tägliche Implantation normaler Hypophyse

---

Abbildung 70

Schema der Wirkung der Normalallele a^+, cn^+ und wa^+ einerseits und des mutierten Allels wa (weißäugig) andererseits nach Augentransplantationen (aus Kühn 1961).

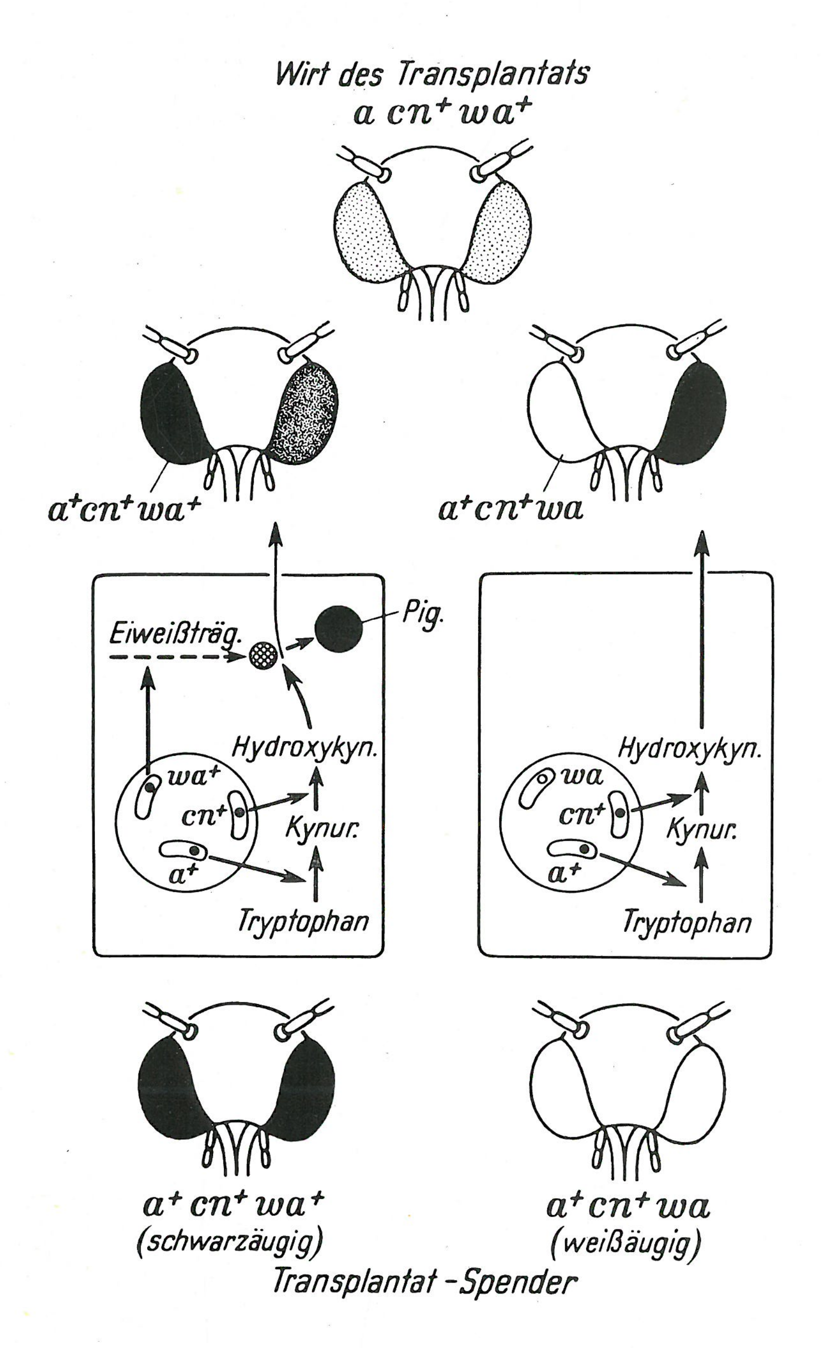

Wirt des Transplantats
a cn+ wa+
a+cn+wa+
a+cn+wa
Pig.
Eiweißträg.
Hydroxykyn.
wa+
cn+
Kynur.
a+
Tryptophan
Hydroxykyn.
wa
cn+
Kynur.
a+
Tryptophan
a+ cn+ wa+
(schwarzäugig)
a+cn+wa
(weißäugig)
Transplantat-Spender

Abbildung 71

Stufen der Ommochromsynthese nach Butenandt und Mitarbeiter und Genwirkketten nach Kühn und Mitarbeiter. Schema der Wirkung von Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin auf a- (= v) und cn-Mutanten, bei Ephestia in Puppen injiziert, bei Drosophila an Larven verfüttert. Bei Zugabe von 3-Hydroxykynurenin kann a^+ (= v^+) vorhanden sein oder fehlen, da das cn^+-Produkt eine höhere Reaktionsstufe darstellt (aus Kühn 1961).

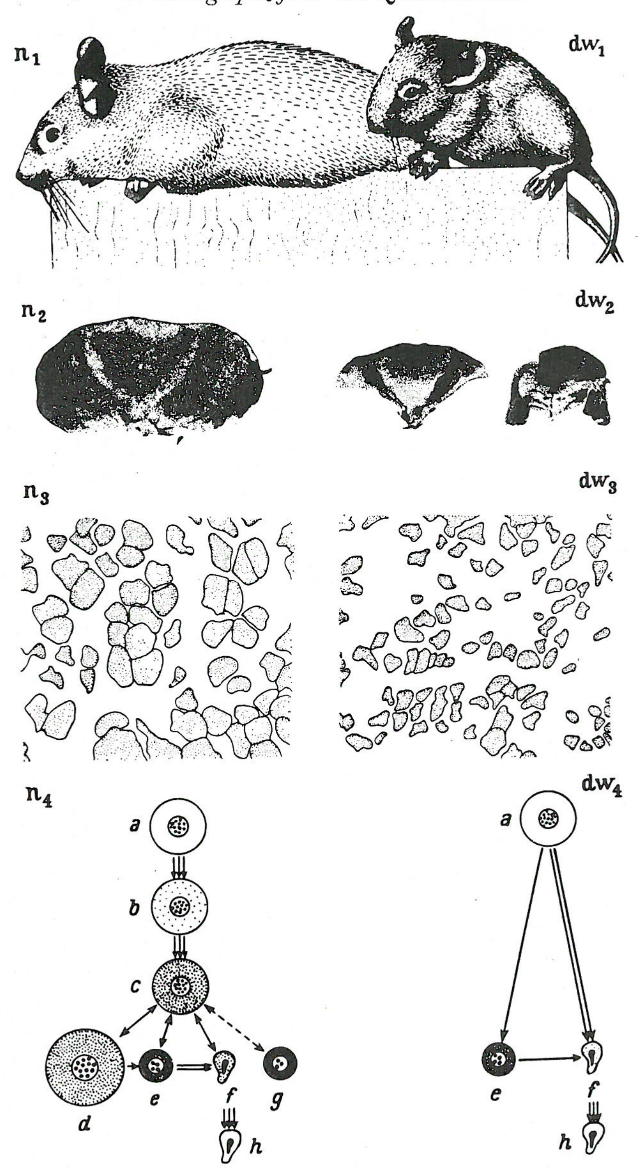


Abbildung 72
Wirkung des Gens für hypophysären Zwergwuchs (dwarf, dw) der Maus im Vergleich zur Normalentwicklung (n); n_1 und dw_1 sind Geschwistertiere im Alter von 2,5 Monaten, n_2 und dw_2 die freipräparierten Hypophysenvorderlappen einer Normalmaus (links) und zweier dw-Tiere (rechts); n_3 und dw_3 Zellgrößen im Hyophysenvorderlappen, n_4 und dw_4 hypothetische Zellgenealogie in der Hypophyse. Bei der Mutante fallen die großen acidophilen Zellen aus (aus Hadorn 1955).

konnten Smith und Macdowell (1930) ein weitgehend normales Wachstum der dw/dw-Mäuse erzielen, wobei die behandelten Tiere die Geschlechtsreife erlangten, und auch die Schilddrüsen und Nebennieren sich normalisierten. Einzig die dw/dw-Hypophyse blieb von der Behandlung unbeeinflußt. Die Schädigung erscheint hier autophänisch und irreparabel durch die genetische Konstitution der merkmalsbildenden Zellen selber bedingt. Die übrigen Merkmale des pleiotropen Schädigungsmusters sind allophänisch verursacht und daher therapeutisch zu beeinflussen.

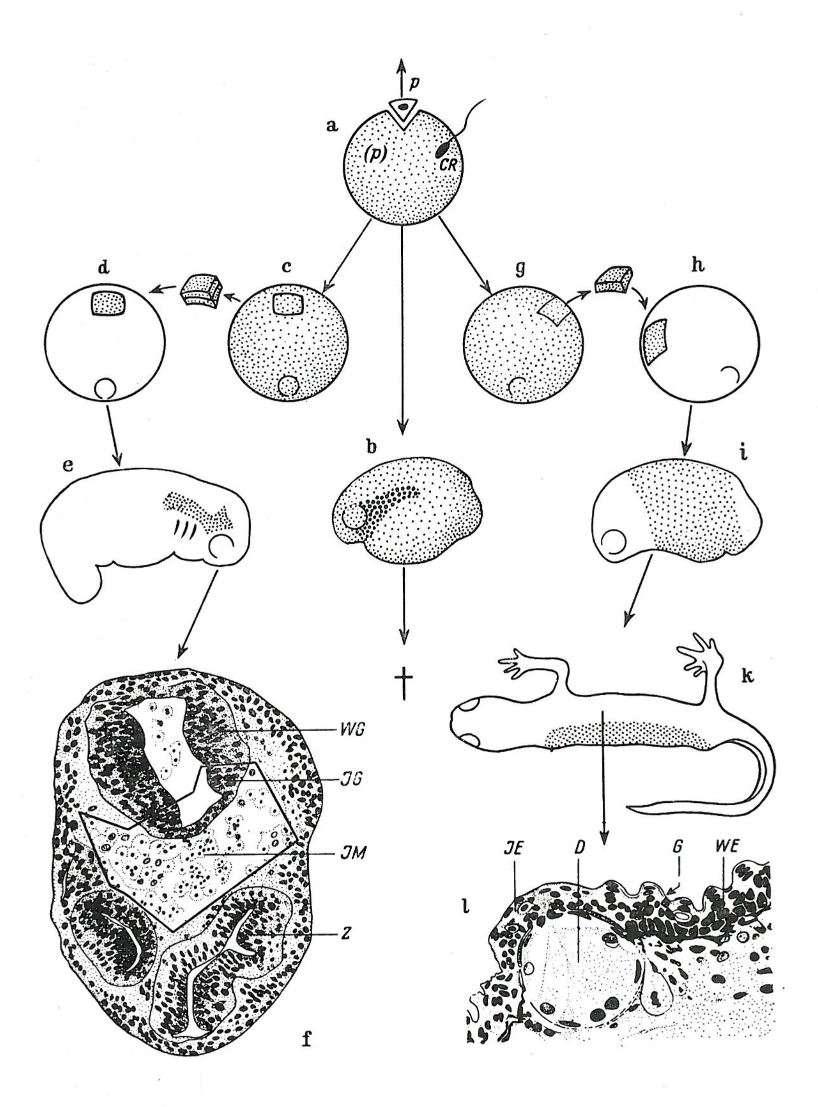
Abschließend sei noch ein Experiment von E. Hadorn (1932, 1937, 1955) als Beispiel aus der Amphibienentwicklung angeführt. Molcheier werden künstlich durch Spermien einer anderen Art besamt (in unserem Fall Eier von Triturus palmatus und Spermien von T. cristatus), worauf der mütterliche Vorkern durch Absaugen entfernt wird (Abbildung 73a). Die so erhaltenen Bastardandromerogone gehen infolge von Disharmonien zwischen dem fremden Kern und dem Cytoplasma regelmäßig auf frühen Embryonalstadien zugrunde (Abbildung 73b). Dabei ist das Kopfmesenchym zuerst und am stärksten von der Schädigung betroffen (in b stärker punktiert). Wird die noch gesunde Anlage dieses Materials auf einem frühen Stadium in einen Normalkeim transplantiert, so geht es dort ebenfalls zugrunde (Abbildung 73 c–f). Sein Zerfall erfolgt synchron mit dem in den bastardmerogonischen Ganzkeimen; er ist also auto-

---

Abbildung 73

Transplantation bastardmerogonischer Gewebe bei Amphibienkeimen. a) Entkernung eines Eies von Triturus palmatus (p) und Fremdbesamung mit Spermien von Triturus cristatus (cr). b) Absterbender Ganzmerogon. c–d) Übertragen der Anlagen von Gehirn und Kopfdarmdach in den Normalkeim. e) Wirt mit Implantat im Innern (punktiert). f) Schnitt durch die Kopfregion von e) WG = Wirtsgehirn, IG = Implantatgehirn, IM = implantiertes Kopfmesenchym (die pyknotischen Kerne sind zur Verdeutlichung etwas zu groß gezeichnet), Z = Augenblase in Verbindung mit dem Zwischenhirn. g–h) Übertragen von präsumptiver Epidermis. i) Lage des Implantats (punktiert) im Augenblasenstadium. k) Der metamorphosierte Wirt mit bastardmerogonischem Implantat und Angabe der Lage der darunterstehenden Schnittes (1). l) Schnitt durch die Hautstelle, wo Implantatsepidermis (IE) an die Wirtsepidermis (WE) grenzt; D = Hautdrüse, G = Grenze zwischen haploiden (links) und diploiden Kernen (rechts). (Aus Hadorn 1955.)

nom und stadiumspezifisch. Ganz anders verhält sich das in den Normalkeim transplantierte bastardmerogonische Ektoderm (Abbildung 73 g–l): es setzt hier seine Entwicklung ungestört fort, metamorphosiert und bildet dabei typische adulte Hautstrukturen. Eine normale Ausdifferenzierung (wenigstens bis zum Verbrauch der eigenen Dotterreserve) der bastardmerogonischen Epidermis ist aber auch im Explantat, also ohne Kontakt mit normaler Unterlagerung



möglich (Hadorn 1934), während bastardmerogonisches Nervengewebe durch angrenzendes Normalgewebe eine deutliche Steigerung seiner Entwicklungsleistung erfährt (Hadorn 1937). Damit zeigen die einzelnen bastardmerogonischen Gewebe alle Übergänge von früher zellautonomer Letalität beim Kopfmesenchym zu einer Abhängigkeit von spezifischer Entwicklungshilfe beim Nervengewebe bis zu einer weitgehend autonomen Selbstdifferenzierungsfähigkeit bei der Epidermis.

Auf Grund eines erdrückenden Tatsachenmaterials, von dem hier nur einige Proben geboten werden konnten, kommt Hadorn (l. c. S. 284) zu folgender Feststellung: «Unter den erbbedingten Entwicklungsanomalien gibt es sowohl heilbare als auch unheilbare Zustände. Es ist daher grundsätzlich falsch, mit dem Begriff des Erbleidens die Vorstellung zu verbinden, daß eine erfolgreiche Therapie ausgeschlossen wäre. Die Aufgabe des Therapeuten müßte eigentlich darin bestehen, durch experimentelles Eingreifen im Entwicklungssystem der Mutante eine vollständige Phänokopie des normalen Genotypus zu erreichen.»

Wirkung und Wirkungsspezifität auf leukämische Blutbildverschiebungen

VON PROF. DR. MED. F. SCHMID, HEIDELBERG

Ausgehend von der experimentell mehrfach gesicherten Möglichkeit, biologische Reaktionsprodukte, wie «erworbene» Antikörper, auf andere Lebewesen in spezifischer Funktion zu übertragen, war die Frage zu prüfen, ob auch die nativen Potenzen jugendlicher Gewebe übertragbar sind. Geeignet für diese Fragestellung erschien das Leukämieproblem.

Durch theoretisch zunächst schwer deutbare, erfolgreiche Versuche gelang es, selektiv erworbene Eigenschaften eines Individuums mit Geweben auf ein anderes Lebewesen zu übertragen (Mc. JUNKIN, CASPARI u. a.). LANDSTEINER konnte 1942 eine Überempfindlichkeit gegen eine chemische Substanz (Pikrylchlorid) mittels Peritonealexsudatzellen von allergischen Tieren auf normergische überimpfen. CHASE (1945) hat analog dazu eine erworbene biologische Eigenschaft, die Tuberkulinallergie, mit Zellen von Tier zu Tier übertragen; beim Menschen ist, wie sich später ergab, eine Allergieübertragung durch Blut- und Austauschtransfusionen möglich. In breit angelegten Versuchen konnte (F. SCHMID und Mitarbeiter) mit folgenden Zellen und Geweben die Tuberkulinallergie bei gesunden Tieren induziert werden: Peritonealexsudatzellen, Pleura-, Liquorzellen, Lymphgewebe, Leber und Milz. Die induzierte Allergie dauert 1–12 Wochen.

Wenn nun erworbene Eigenschaften durch Zellen übertragen werden können, so müßten die den Zellen physiologischerweise innewohnenden Potenzen noch leichter zu übertragen sein. Dieser Analogieschluß war der Ausgangspunkt einer über zweieinhalb Jahre (1954–1957) sich erstreckenden tierexperimentellen Serie über die *Beeinflussung des Blutbildes durch verschiedene Zellsuspensionen.* Die Blutkörperchen-Abkömmlinge des Mesenchyms sind unserer Beobachtung leicht zugänglich, wodurch die Voraussetzung gegeben war, ihre quantitativen und qualitativen Veränderungen objektiv zu registrieren. Praktischer Hintergrund war dabei das Su-



Abbildung 74
AK Maus ohne Krankheitsmanifestationen.

chen nach einer therapeutischen Wirkung von Zellsuspensionen auf leukämische Blutbildverschiebungen.

Als Versuchsobjekt dienten AK-Mäuse, welche seit 1928 am Dr. FURTH-Laboratory, New York, gezüchtet werden. Es handelt sich dabei um einen Inzuchtstamm, bei welchem im 6.–9. Lebensmonat in einem hohen Prozentsatz Leukosen auftreten. Die ausgedehnten Beobachtungen am verwendeten Stamm ergaben zwar eine Übereinstimmung mit dem von anderen Beobachtern (LEFEVRE, HOGREFFE, PEDERSEN u. a.) beschriebenen klassischen Krankheitsbild; Blut-, Mark- und histologische Untersuchungen gestatten es jedoch nur von einer ausgeprägten «myeloischen Reak-



Abbildung 75
AK-Maus mit beginnenden Krankheitssymptomen. Haarausfall und Geschwürsbildungen im Bereich der Schnauze, Augen und Ohr.

tion» zu sprechen, welche morphologisch den menschlichen Leukosen nur entfernt ähnelt.

Die Würfe unseres von zwei Stammpärchen aus gezüchteten Stammes erkrankten mit einer hohen Frequenz (70–90%) im 6.–8. Lebensmonat spontan an dieser «myeloischen Reaktion» und gingen innerhalb von 4–8 Wochen an einem einförmigen Krankheitsbild, welches im Krankheitsablauf viele Parallelen zur kindlichen Leukose zeigte, ein.

Diese im gleichen Alter und in der gleichen Form auftretende erbgebundene Krankheit ist folgendermaßen zu skizzieren:

Bei den zunächst gut gedeihenden, vitalen weißen Mäusen wird im Laufe des 5. oder 6. Lebensmonats das Fell trocken, struppig und verfärbt sich gelblich, es kommt zum Haarausfall (Abbildung 75), 2–3 Wochen später stellt sich Freßunlust ein, die Tiere werden allmählich matt. Im Bereich der Schnauze und der Anal-Genitalregion fallen schließlich die Haare ganz aus (Abbildung 77), es bilden sich derbe Infiltrate bis Haselnußgröße, welche einschmelzen, zerfallen, eitern und verkrusten. Im Schwanz der Tiere treten knotenförmige Verdickungen (Abbildung 76) auf, welche seltener ulcerieren.

Im Blutbild nehmen die Leukocytenzahlen um das 2–5fache zu, die jugendlichen und segmentkernigen Granulocyten sowie myeloische Frühformen vermehren sich, während die Lymphocyten – welche bei gesunden weißen Mäusen 60–80% aller weißen Blutzellen darstellen – relativ oder absolut zurücktreten. Mit diesen Verschiebungen im weißen Blutbild geht eine progrediente Anämie parallel, das Blut wird dünn, zeigt eine hellere Farbe; eine Blut-

Abbildung 76

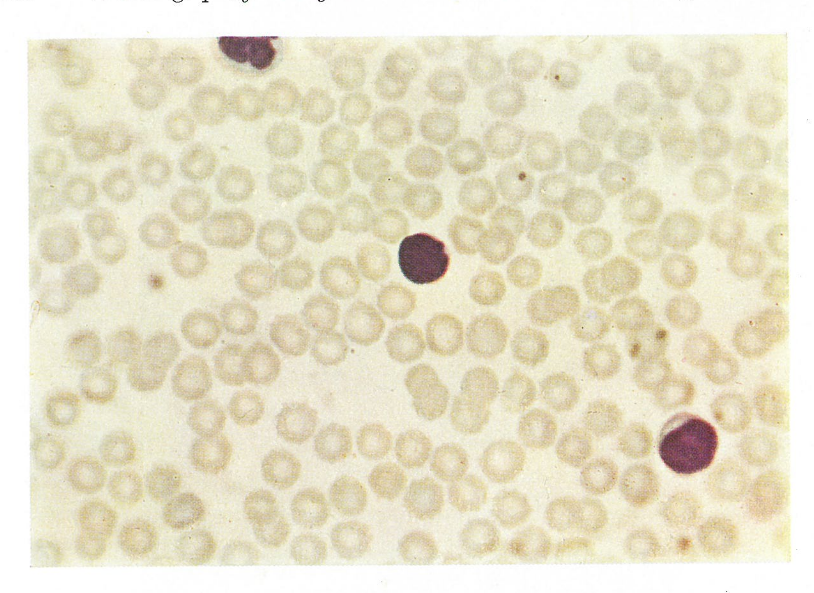


Knotenbildungen im Schwanz einer AK-Maus mit leukämoiden Blutbildveränderungen.

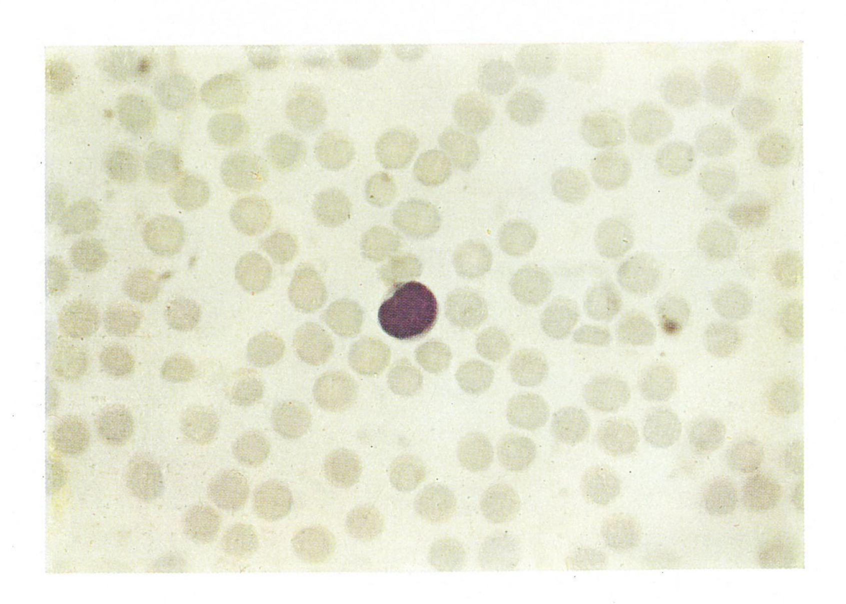


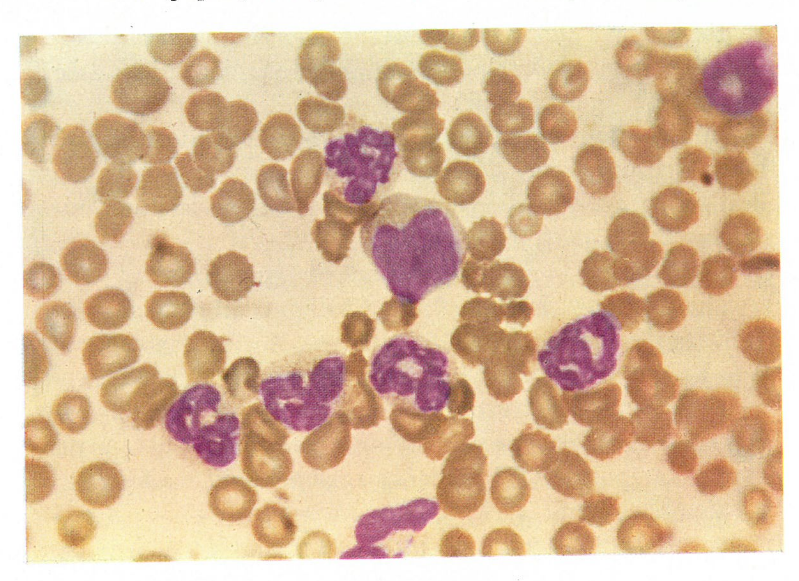
Abbildung 77
Floride Krankheitsmanifestation mit leukämoiden Blutbildveränderungen bei einer AK-Maus im 7. Lebensmonat.

stillung ist im fortgeschrittenen Stadium oft kaum möglich. Der Zustand der Tiere verschlechtert sich sehr rasch, so daß sie innerhalb 4–8 Wochen nach Auftreten der ersten Krankheitszeichen an einer allgemeinen Kachexie zugrunde gehen. Autoptisch findet man in den meisten Fällen Vergrößerungen von Leber, Milz und Lymphknoten. Leber und Milz sind weich, brüchig, zeigen eine fleckige Zeichnung und können wegen der leichten Verletzbarkeit nur schwer von ihren physiologischen Verwachsungen mit Nachbarorganen getrennt werden. Im histologischen Bild fallen Zellinfiltrationen und amyloide Einlagerungen auf.



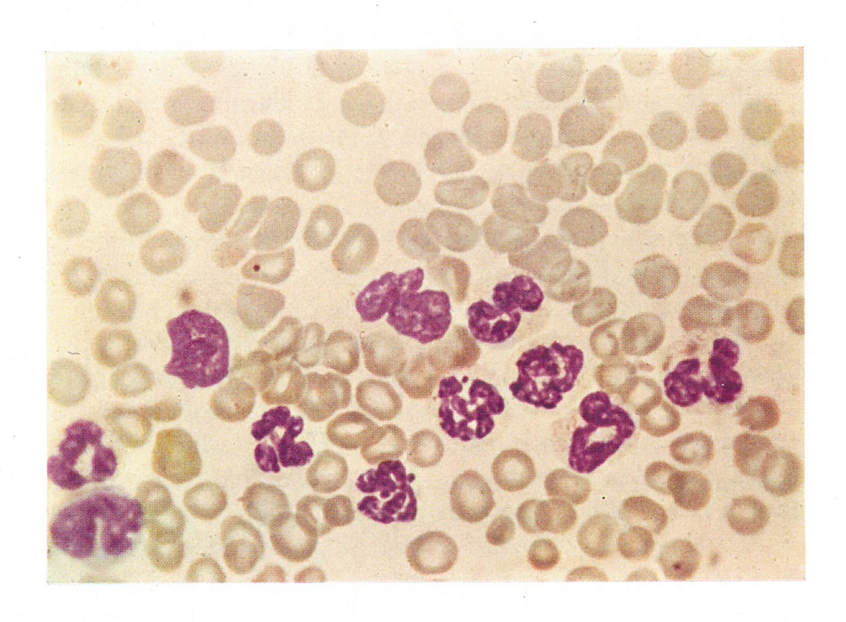
Abbildungen 78a und b
Blutbildausstriche von AK-Mäusen ohne Krankheitszeichen. Spärlich Zellen, überwiegend Lymphocyten.





Abbildungen 79a und b

Blutbildausstriche von AK-Mäusen auf dem Höhepunkt der leukämoiden Blutbildverschiebungen. Erhebliche Zellzahlvermehrung. Überwiegen von atypischen Jugendformen der granulocytären Reihe. Vereinzelt atypische Monocytoide.



An diesem erblichen, mit Blutbildveränderungen einhergehenden Krankheitsbild mit relativ konstanten Manifestationsalter wurden folgende Fragen geprüft:

1. Lassen sich die progredienten Blutbild- und Allgemeinstörungen durch Zellsuspensionen beeinflussen?
2. Sind gegebenenfalls die verwendeten Zellarten in ihrer Wirkung gleichwertig?
3. Ist die Wirkung vorübergehend oder langdauernd?
4. Welche Nebenwirkungen treten bei intraperitonealer Verabreichung der Zellsuspensionen auf?

Diese Fragen wurden in vier Versuchsgruppen geprüft.

In der *ersten* Versuchsgruppe, welche sich aus sieben Versuchsreihen an einzelnen Würfen zusammensetzte, kamen artfremde Trockenzellpräparate verschiedener mesenchymaler Organe (Milz, Leber, Knochenmark, Thymus) zur Anwendung.

In der *zweiten* Versuchsgruppe, die aus vier Versuchsreihen bestand, wurden artgleiche, frische fetale Zellsuspensionen (Gesamt- und Organsuspensionen) eines gesunden Albino-Mäusestammes geprüft.

Die *dritte* Versuchsgruppe umfaßte vier Kontrollserien, wobei in einer Serie die Wirkung von Knochenmarktrockenzellen auf gesunde Mäuse untersucht wurde, in zwei weiteren Serien Eiweißsubstanzen (Seren) klären sollten, ob die beobachteten Wirkungen unspezifische Eiweißeffekte darstellen oder nicht.

In einer *vierten* Serie, welche mit Gehirntrockenzellen beschickt wurde, stand zur Prüfung, ob auch ektodermale Gewebe einen Einfluß auf das Blutbild haben.

Eine weitere Versuchsgruppe mit vier Versuchsreihen griff die Frage nach dem Effekt von Zellsuspensionen kranker Tiere des gleichen Stammes auf.

Die vier Versuchsgruppen gliedern sich somit in 19 Versuchsreihen auf. Insgesamt standen 313 Tiere im Versuch, davon 250 AK-Mäuse und 63 gesunde weiße Mäuse. 63 AK-Mäuse liefen als Kontrollen zu den jeweiligen Versuchsreihen. Diese Versuchsserien umfaßten je nach den Würfen 4–20 Tiere, wobei meist ein Wurf, gelegentlich zwei Würfe verwendet wurden.

Einleitend war es jedoch notwendig, an 30 gesunden Mäusen sich einen Einblick in die Norm der Leukocytenzahlen und das Diffe-

rentialblutbild zu verschaffen. Dabei zeigte sich, daß die Werte je nach der Art der Blutentnahme große Schwankungen aufwiesen. Dazu wurde durch Scherenschlag das Schwanzende der Tiere abgeschnitten, und das Blut für die Untersuchung aus dem Stumpf entnommen. Die Ergebnisse waren bereits unterschiedlich, wenn der Schwanz, um besser zu bluten, vor dem Abschneiden in warmes Wasser eingetaucht wurde. Aber auch durch Pressen und Quetschen am Schwanzstumpf wurden die Zellzahlen beeinflußt, was wohl im wesentlichen auf Beimengung von Gewebsflüssigkeit zurückzuführen war. Bemerkenswert war auch die Feststellung, daß die Werte bei Blutentnahme aus dem Herzen eines getöteten Tieres meist bis zu 100% niedriger lagen als im Schwanzblut des gleichen Tieres.

Um zu vergleichbaren Werten zu gelangen, war es erforderlich, stets die gleiche Methode anzuwenden. Dabei schien es uns am günstigsten, den Tieren vor Abschneiden des Schwanzes eine kurze Äthernarkose zu geben. Durch die darauffolgende Entspannung gelang es, ohne Drücken und Pressen am Schwanzende, die erforderliche Menge Blut zur Untersuchung zu erhalten. Die Leukocytenzahlen wurden durch Auszählen in der Thoma-Kammer errechnet, die Blutausstriche sind einheitlich nach PAPPENHEIM gefärbt worden. Auch von einer größeren Anzahl kranker Tiere mußten in Vorversuchen Blutausstriche angefertigt werden, um die manchmal nicht leichte Einordnung pathologischer Zellen in den Versuchsserien einheitlich handhaben zu können. Zur Herstellung der Trockenzellsuspensionen wurde die entsprechende Zellsubstanz in Ringerlösung aufgelöst; zur Bereitung der fetalen Zellsuspensionen wurden schwangere Tiere kurz vor dem Werfen getötet, ihre Bauchhöhle eröffnet und die Embryonen steril aus dem Uterus herausgelöst; sodann wurden diese entweder in toto oder nur entsprechende Organe mit der Schere zerkleinert und im Mörser zu einem Gewebebrei verrieben. Dieser wurde mit Ringerlösung verdünnt und aufgeschwemmt, um danach durch eine sterile Gaze filtriert zu werden.

Sämtliche Zellsuspensionen und Testsubstanzen (Seren) wurden intraperitoneal injiziert. Die Suspensionsmenge betrug innerhalb der Serien einheitlich 0,4 bis 1,0 cm^3.

Bei allen Versuchsserien wurde jeweils vor der Injektion eine Blutuntersuchung durchgeführt, die sich auf Auszählen und Diffe-

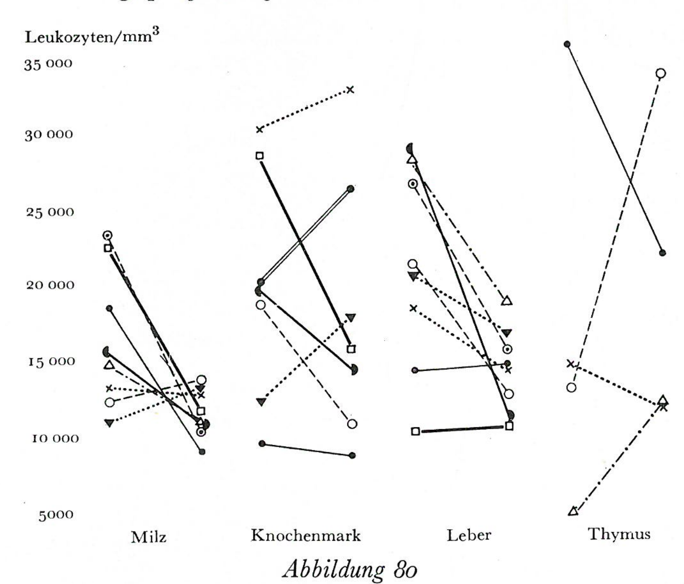


Abbildung 80

Unterschiede der Wirkung verschiedener mesenchymaler Gewebe auf die Zellzahl von AK-Mäusen des gleichen Wurfes 3 Tage nach intraperitonealer Gewebsinjektion.

renzieren der weißen Blutzellen beschränkte. Die erste Kontrolluntersuchung erfolgte drei Tage nach der Injektion. Weitere Kontrollen wurden erst nach längerem zeitlichem Intervall – meist 3–4 Wochen – vorgenommen, da eine zu häufige Entnahme auch nur einer geringen Blutmenge bei den Tieren schon von selbst zu einer beträchtlichen Anämie geführt hätte. Die im Versuch stehenden Tiere wurden aber laufend beobachtet und ihre Überlebenszeit genau registriert.

Ergebnisse

Gehen wir von den theoretischen Voraussetzungen, welche zu den Versuchen führten, nämlich einer Übertragung der biologischen Potenzen fetaler Gewebe auf ein insuffizientes Blutbildungssystem aus, so hat sich ergeben:

Mesenchymale Gewebe haben mit unterschiedlichem Wirkungsgrad einen faßbaren, oft tiefgreifenden Einfluß auf das Blutbild und den Krankheitsablauf manifest kranker AK-Mäuse.

Innerhalb von drei Tagen nach der intraperitonealen Injektion kommt es zu einer Abnahme der Leukocytenzahl bis zu maximal

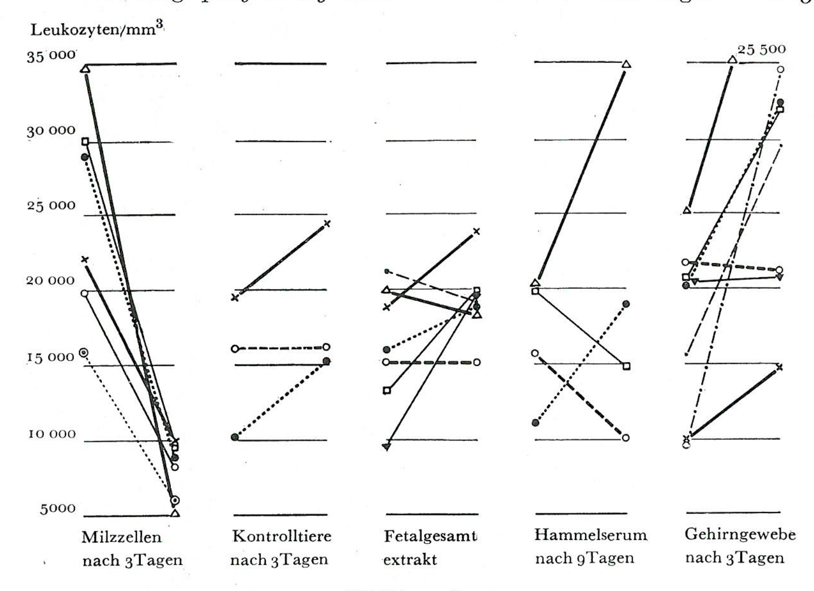


Abbildung 81

Kontrollen der Wirkungsspezifität (zum Beispiel bei Milzzellen) mit artfremden Seren und Fetalgesamtextrakten gesunder Mäusestämme sowie ektodermalen Geweben. Verhalten der Zellzahl 3 Tage nach Injektion.

über 80% der Ausgangswerte. Das Differentialblutbild verschiebt sich in Richtung einer Normalisierung (Abbildung 82), die Granulocyten, Jugend- und Frühformen der myeloischen Reihe nehmen im Durchschnitt um 30–40% ab, die Lymphocyten relativ, nicht selten auch absolut zu. Parallel zu den Blutbildverschiebungen tritt eine Besserung des Allgemeinbefindens ein, die Tiere fressen besser, werden vitaler, das Fell wird wieder dichter und glänzender, die Knoten- und Geschwürsbildungen kommen zum Stillstand oder bilden sich sogar zurück.

Die durchschnittliche Lebensdauer der so behandelten Tiere liegt bei wirksamen Zellsuspensionen um etwa zwei Monate höher, als die unbehandelter Würfe oder der nicht injizierten Kontrolltiere aus dem gleichen Wurf. *Anaphylaktische Reaktionen* wurden nur bei Seruminjektionen beobachtet.

Die unterschiedliche Wirkung der einzelnen mesenchymalen Gewebe auf die Zellzahl macht die Abbildung 80 deutlich. In der Abbildung 81 sind dagegen die Kontrollserien (Gehirnsubstanz, Se-

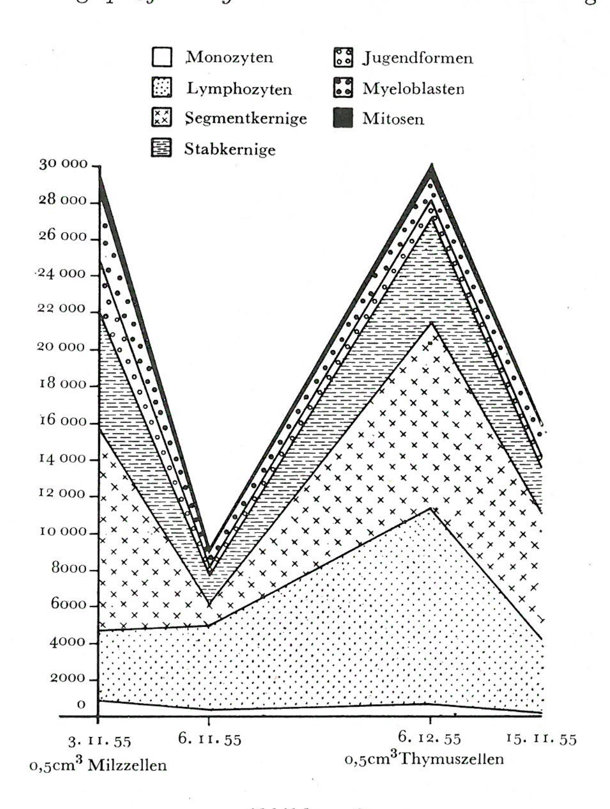


Abbildung 82

Blutbildverschiebungen (Zellzahl und Differentialblutbild) nach Injektion gefriergetrockneter heterologer Gewebe. Abnahme der Zellzahl, Normalisierung des Differentialblutbildes.

rum) der Wirkung von Milzsuspensionen gegenübergestellt. Die unterschiedliche Zahl der Fälle in den einzelnen Reihen ergibt sich aus der Verwendung von Würfen, um die Homogenität des Materials zu gewährleisten. Besonders interessant und theoretisch zunächst kaum aufklärbar ist die Beobachtung, daß sich nach Injektion wirksamer Zellsuspensionen die Zellzahl «normalisierte», unabhängig davon, wie hoch sie vorher lag. Die erwähnenswert unterschiedlichen Resultate bei Injektionen fetalen «Knochenmarkes» haben erst später eine Aufklärung erfahren; es handelt sich bei diesem Gewebe um grobe osteoide Splitter, die kein funktionstüchtiges Knochenmark enthalten.

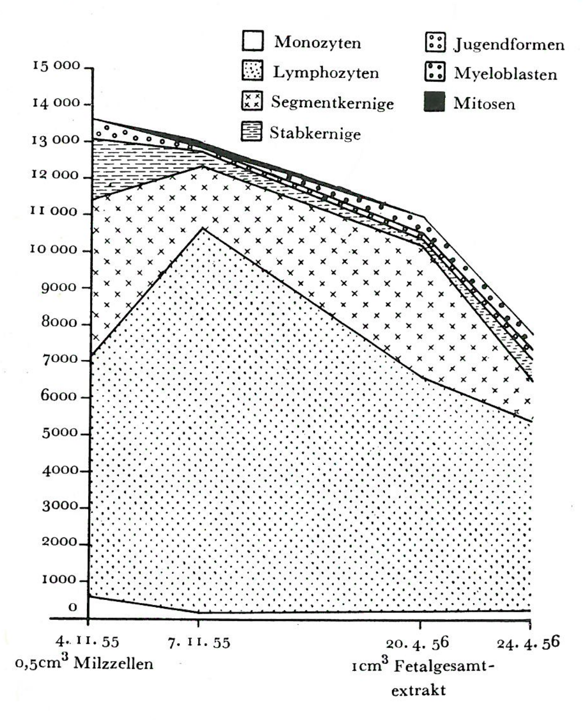


Abbildung 83

Tendenz zur Normalisierung des Differentialblutbildes 3 Tage nach Injektion von mesenchymalem fetalem, heterologem Gewebe (Milz).

Blutbildveränderungen und der Einfluß auf das Allgemeinbefinden sind passagere Phänomene, welche 4–8 Wochen, im Durchschnitt 6 Wochen nach einer Injektion anhalten. Der Effekt ist reproduzierbar, wobei man allerdings den Eindruck hat, daß bei nachfolgenden Zellgaben das Allgemeinbefinden weniger nachhaltig beeinflußt wird.

Der Grundgedanke, die biologischen Potenzen fetaler Gewebe auf Tiere übertragen zu können, erwies sich zwar als richtig, für die *praktisch therapeutischen Konsequenzen* bedeutete das Ergebnis aber eine enttäuschende Einschränkung.

Es hat sich gezeigt, daß der erkrankte Organismus zwar vorübergehend die biologischen Potenzen gesunder Gewebe verwertet, nach

deren Verbrauch aber die Eigengesetzlichkeit seiner Krankheit zumindest bei tumorartigen Prozessen fortsetzt.

So begrenzt also diese Resultate hinsichtlich der Ausgangsfragestellung waren, so hatten sie doch für die Beurteilung der Wirkung injizierter Zellen recht aufschlußreiche *Ergebnisse:*

1. Die Wirkung injizierter Zellen beruht bei unserer Versuchsanordnung auf einer *Induktion*, führt aber *nicht* zu *einer Regeneration.* Tierexperimentell ist damit erhärtet, was die klinischen Erfahrungen mit den gebräuchlichen therapeutischen Frischzellenverfahren (Bluttransfusionen, Hypophysenimplantationen, Haut- und Gefäßtransplantaten) bereits erwarten ließen.
2. Die Wirkung injizierter Zellen ist *zellspezifisch*, sie beruht nicht auf einer unspezifischen Eiweißwirkung. Mit zellfreien Eiweißträgern werden keine Effekte gesehen.
3. Die Wirkung injizierter Zellen und Gewebe ist *keimblattspezifisch, im Ausmaß sogar organspezifisch.*
   Während die geprüften mesenchymalen Gewebe durchweg die beschriebenen Blutbildveränderungen hervorriefen, wurden diese nach Injektion ektodermaler Gewebe vermißt. Die mesenchymalen Gewebe sind im Grad ihrer Wirkung aber nicht gleichwertig. Bei unserer Versuchsanordnung zeigten sich die Blutbildverschiebungen am deutlichsten und konstantesten nach Milzinjektionen und Leber, weniger konstant nach Knochenmarkgaben und Thymus.
4. Die spezifischen Effekte der arteigenen und artfremden Gewebe können durch arteigene Fetal-Gesamtsuspensionen nicht erzielt werden. In Einzelfällen führten die Injektionen zerriebener Mäusefeten eines gesunden Stammes, vor allem aber des AK-Stammes, zu einer Verschlechterung des Blutbefundes.

Mit dieser langfristigen Versuchsserie war

a) die differente spezifische Wirkung an heterologen und homologen Gewebssuspensionen,
b) die temporäre Beeinflussung leukämieartiger Blutbildveränderungen objektiviert,
c) ergaben sich bei intraperitonealen, wiederholten Injektionen keine Anhaltspunkte für eine Antigenität heterologer fetaler Zellen, während artgleiche homologe Gewebe adulter Tiere wiederholt Schocksymptome auslösten.

Die Objektivierung organspezifischer Wirkung zellulärer Präparate

VON DR. MED. J. STEIN, HEIDELBERG

Zum Nachweis einer organotropen Wirkung einer Substanz gehört ein reaktionsbereites Organ. Der experimentelle Nachweis einer positiven stimulierenden Wirkung kann verschiedener Art sein. Im günstigsten Falle, am wachstumsbereiten Modell, kann eine Vermehrung des lebendigen Materials oder der Zellzahl nachweisbar werden. Die Bestätigung einer Stoffwechselsteigerung an einem bestimmten Organ kann als Auswirkung stimulierender Wirkung in Erscheinung treten. Auch gesteigerte Funktion oder Syntheseleistung kann als spezifische Reaktion zum Beweis einer positiven Beeinflussung herangezogen werden. Eine solche Beziehung, etwa die Normalisierung einer endokrinen Drüse oder die Revitalisierung eines unterfunktionierenden Organes, ist naturgemäß häufig der klinisch erwünschte Effekt.

Diese im weitesten Sinne positiv stimulierenden Wirkungsbeziehungen sind an sich im klinischen Bereich nachweisbar, aber selten objektiven Methoden der Bestätigung zugänglich. Ihre Überlagerung durch komplexe Beziehungen – Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Reaktionslage, Ernährung, Krankheiten sowie art- und stammspezifischen Faktoren – macht im Einzelfall den Nachweis fraglich und führt zur Notwendigkeit klinischer Statistik mit allen daraus resultierenden Fehlerquellen.

Beim Studium von zusammenfassenden Arbeiten über die Objektivierung von Wachstumsfaktoren (Paschkis, Wrba) ist es überraschend festzustellen, wie viele Methoden bereits angewendet wurden. Schon 1916 fand Murphy eine Vergrößerung der Milz beim Hühnchenkeim, wenn Milzbrei erwachsener Hühner auf die Chorioallantois-Membran des Eies gebracht wurde. Der Nachweis einer wachstumsstimulierenden Wirkung von Organbrei auf das korrespondierende embryonale Organ wurde seit damals in einer Vielzahl von Experimenten mit verschiedenartiger Versuchsanordnung wie-

derholt. Die Arbeitsgruppe von Paul WEISS hat geradezu klassische Ergebnisse für die Wachstums-Beeinflussung des embryonalen Organes in vivo durch homologen Organbrei geliefert. WEISS und WANG konnten eine Steigerung der Zellteilungen und eine Vergrößerung des ganzen Organes an der Leber des Hühnchens nachweisen, wenn Leber eines zwei Tage älteren Keimes auf die Chorioallantois-Membran gebracht wurde. ANDRES fand beim Hühnchen eine analoge Wirkung bei Verwendung von Niere.

EBERT hat analoge Versuche mit Schwefel^{35} markiertem Gewebe durchgeführt und kam zu dem Schluß, daß organspezifische Proteine die stimulierende Fraktion darstellen. Er nimmt an, daß höhermolekulare Bausteine von der Zelle aufgenommen und für die zelleigene Synthese verwendet werden können. Eine große Zahl von Untersuchungen dieser Richtung weist auf die Wirkung «organspezifischer Stimulatoren» hin.

Am genauesten ist die Zufuhr homologer Organpräparate in ihrer Wirkung auf die Leber untersucht. Daß gerade die Leber so eingehend untersucht ist, erklärt sich daraus, daß embryonale Leber leicht zu gewinnen und als Empfängerorgan besonders reaktionsbereit ist. Auch die ruhende, erwachsene Leber läßt sich zu einer Art regenerativen Wachstums bringen, wenn entsprechende biogene Stimulatoren wirksam werden. Bei anderen Organen ist ein derartiger Wachstumsreiz morphologisch nicht nachweisbar, weil die meisten parenchymatösen Organe nicht zur Zellteilung zu bringen sind.

Für die Veranschaulichung einer Wirkung von homologen Zellen auf ein bestimmtes Organ sind beide Teile – das Wirkungssystem und das Reaktionssystem – entscheidend. Mit anderen Worten: der Zustand, die Vitalität und die Herkunft der Zellen einerseits und die Reaktionsbereitschaft und die Fähigkeit zur Reizbeantwortung im Empfängerorgan andererseits determinieren Art und Umfang der Reaktion. TEIR und RAVANTI konnten durch Zufuhr von Leberbrei embryonaler Herkunft bei lebenden Tieren Zellteilungen am besten in der LEBER des Empfängertieres auslösen. Nicht reaktionsbereite Organe oder vielleicht Organe, die keine nachweisbare Reaktion zeigen, sind für die Objektivierung von Wirkungsbeziehungen nicht geeignet. Es ist vorstellbar, daß zwar eine Reaktion eintritt, diese jedoch in einem derartig spezifischen biochemischen

Bereich abläuft, daß sie nicht sichtbar gemacht werden kann. Häufig gelingt es aber, durch einen Kunstgriff die beabsichtigte Wirkung zu veranschaulichen, und zwar, indem man das Empfängerorgan in eine Regenerationsphase oder in einen Mangelzustand versetzt. Ein Modell für eine solche Beziehung lieferte HALSTED schon 1909. Ihm gelang die Übertragung von Nebenschilddrüsen von Hund zu Hund in die Milz oder in den Muskel nur, wenn er vorher durch Entfernung eines Teiles der Nebenschilddrüse im Empfängertier eine Unterfunktion und einen «Bedarf» erzeugt hatte. Daraus ergibt sich, daß für den Nachweis organspezifischer Wirkung von Zellpräparaten die Auswahl einer geeigneten Versuchsanordnung, mit anderen Worten die Gewinnung eines kompetenten Reaktionssystems, von entscheidender Bedeutung ist. Häufig genügt es auch, das funktionierende erwachsene Organ der normalen humoralen Korrelation zu entziehen – zum Beispiel indem man es explantiert – um es für die Reaktion auf eine spezifische Wirkung empfänglich zu machen.

Durch parenterale Zufuhr von Leberbrei wird ein Anstieg mitotischer Zellteilungen in der Leber des Empfängertieres hervorgerufen. Versuche dieser Art gelangen bei der Ratte (MC JUNKIN und BREUHAUS sowie BLOMQVIST) und bei der Maus (WILSON und LEDUC). Auch die schon zitierten Befunde von TEIR und RAVANTI wurden mit analoger Versuchsanordnung gewonnen. Diese Ergebnisse legen es nahe, die Wirkung zu verallgemeinern. Durch Auswahl anderer Versuchstierarten ließe sich die Liste der positiven Befunde sozusagen beliebig erweitern. Eine weitere entscheidende Beziehung läßt sich daraus ableiten, daß die hier geschilderten Befunde alle nach kurzfristiger Applikation und kurzen Versuchszeiträumen erzielt wurden. Es liegt in der Natur der Sache, daß die Größenordnung – das heißt die Dosis der zugeführten Präparatmenge, die Applikationsform, die Dauer der Zufuhr und der Versuchszeitraum – entscheidend bei derartigen Experimenten mitspricht. Dabei ist schon die Definition der zugeführten Zellmenge oder der angebotenen Dosis an biologischem Substrat schwierig. Am besten bewährt sich die Angabe des beigebrachten Organfeuchtgewichtes und des Mischungsverhältnisses mit Suspensionsmitteln. Die Angabe des Trockengewichtes, Eiweißgehaltes, Ascherückstandes usw. ist komplizierter und mit Fehlern belastet.

Die fehlende oder nicht nachweisbare Reaktion bei beabsichtigter Veranschaulichung von Wirkungsbeziehungen dieser Art kann daran liegen, daß ein nicht reaktionsfähiges oder aber nicht reaktionsbereites Organ ausgewählt wurde. Es kann aber nach dem oben Gesagten ein scheinbares Ausbleiben der Wirkung auch darauf beruhen, daß die falsche Dosis, eine falsche Applikationsdauer oder ein ungeeigneter Versuchszeitraum ausgewählt wurden.

Einmalige oder kurzfristige Applikation löst Mitosen in der Leber aus – aber auch die länger dauernde Zufuhr von Leberbrei ruft diese Wirkung hervor. Mc Junkin und Breuhaus sowie Wilson und Leduc konnten auch nach ca. 2 Wochen dauernder Applikation von Leberbrei einen Anstieg der Zellteilungen im Leberparenchym nachweisen. Daraus läßt sich ableiten, daß die Leber für derartige Versuche besonders geeignet ist, weil sie auf verschiedene Dosen und unterschiedliche Versuchsdauer positiv reagiert.

Es fällt auf, daß der zugeführte Leberbrei – wenn er vorher dialysiert und dadurch in zwei Fraktionen aufgeteilt wird – in beiden Fraktionen wirkungslos ist. Die Vereinigung der beiden Anteile stellt die Wirkung wieder her. Daraus läßt sich ableiten, daß nur die Integrität der Gesamtheit der Zellinhaltsstoffe zum Auftreten der Wirkung führt. Erst Rekombination aller Komponenten liefert ein wirksames Präparat (Paschkis, Cantarow, Goddard und Zagerman).

Eine Anreicherung spezifischer radioaktiver Substanz im korrespondierenden Organ nach parenteraler Zufuhr von Organbrei aus Tieren, welche mit radioaktiven Isotopen behandelt worden waren, ist mehrfach bewiesen. Walter, Allman und Mahler fanden die vermehrte Ablagerung von markiertem Gewebebrei aus Herz und Leber in den korrespondierenden Organen. Die schon geschilderten Versuche von Ebert mit Schwefel^{35} lieferten das gleiche Ergebnis. Nach Injektion von radioaktiv markiertem Material aus Leberkernen fanden Marshak und Walker eine Anreicherung der aktiven Substanz in der Leber von Empfängerratten. In diesem Falle wurde als Isotop Phosphor^{32} verwendet. In allen diesen Fällen stand die Organspezifität der Beziehung im Vordergrund. Im gekreuzten Versuch, bei Verwendung nicht homologen Organbreies, blieb die Wirkung aus. Bei Verwendung homologer Organe verschiedener Tierarten blieb sie dagegen erhalten.

Ähnliche Beziehungen, wie sie bisher für die Leber geschildert wurden, lassen sich unter bestimmten Bedingungen auch für andere Organe nachweisen. WALTER, ALLMAN und MAHLER fanden ebenso wie TUMANISHVILI, JANDIERI und SVANIDZE eine signifikante Beschleunigung der Herzentwicklung beim Hühnerkeim nach Injektion von Brei aus Herzmuskel. Diese Beziehung konnten sie durch Gewichtsbestimmung der Organe objektivieren. Analoge Ergebnisse fand TEIR, wenn er Organbrei der inneren Orbitaldrüse verwendete: im entsprechenden Organ des Empfängertieres traten Zellteilungen auf. MC JUNKIN und MATSUI konnten nach Zufuhr von Hauthomogenat einen Mitoseanstieg in der Haut der Empfängertiere registrieren.

Im Thymus der Ratte war nach Angaben von ROBERTS und WHITE ein Gewichtsanstieg nach Injektion von Kalbsthymus festzustellen.

Unter bestimmten Bedingungen ist am explantierten Organ eine Wachstumsbeziehung zu objektivieren. Unabhängig von der Regulation im Organismus läßt sich dabei in vitro die wachstumsfördernde Wirkung von organspezifischen Stimulatoren auch an ruhenden erwachsenen Organen veranschaulichen. Offenbar wird durch die Explantation das Organ in eine Phase der Reaktionsbereitschaft versetzt. Möglicherweise bietet auch der eintretende relative Mangelzustand und im Explantat der Fortfall der Wachstumsregulation die Voraussetzung für die eintretende Reaktionsbereitschaft. Es ist zu bedenken, daß unter normalen Bedingungen im gesunden Organismus ein Gleichgewicht zwischen Stimulatoren und Hemmstoffen besteht, so daß zugeführte Stimulatoren nicht zur Wirkung kommen. Es gelingt aber beispielsweise in vitro, durch Zusatz von embryonalem Leberbrei des Hühnchens, das entsprechende überlebende Organ länger vital zu erhalten (CROISEILLE). Daraus ergibt sich, daß die endokrine Regulation und ihr Funktionieren nicht unbedingt Voraussetzung für den Eintritt der geschilderten Wirkungen ist. Mit anderen Worten: die organotrope Wirkung organspezifischer Stimulatoren erfolgt direkt auf das Empfängerorgan. Beobachtungen dieser Art widersprechen der Vorstellung, daß Zufuhr mechanisch zerstörter Zellen im Kreislauf als Reiz für die Produktion und Ausschüttung eines entsprechenden spezifisch organotropen Hormones wirken sollen.

Ein Hinweis dafür, daß durch die Zufuhr von Organbrei die Produktion organspezifisch stimulierender Faktoren ausgelöst wird, findet sich in den Untersuchungen von KALB. Er konnte im Blutserum von Ratten stimulierende Stoffe nachweisen, wenn die Tiere vier bis fünf Tage vor der Gewinnung des Serums Injektionen von embryonalem Leberbrei erhalten hatten. Explantierte Rattenleber zeigte mit Zusatz von derartigem stimuliertem Serum eine höhere Stoffwechselaktivität als bei Verwendung von normalem Blutserum.

Eine nachweisbare Aktivität von Blutserum nach Zufuhr von Organsubstanzen ist logischerweise auf Stoffe zurückzuführen, die zellulärer Synthese entstammen. So wirkt das Blutserum von Tieren, denen ein Teil der Leber vorher operativ entfernt wurde, spezifisch stimulierend auf die Leber. CHRISTENSEN und JACOBSEN fanden als erste, daß die parabiotische Vereinigung einer normalen mit einer teilhepatektomierten Ratte bei der gesunden Ratte zum Auftreten von Zellteilungen im Leberparenchym führt. Die teilhepatektomierten Tiere wurden in der Folge gründlich untersucht. Man kennt seitdem den Eintritt der Wirkung, die Wirkungsdauer und Wirkungsweise bei diesem Experiment mit einer gewissen Sicherheit. Auch nach Entfernung der Hypophyse geht die Regeneration der Leber weiter, so daß dieser Wachstumsstoff nicht mit bekannten Hormonen identisch sein kann. Der Umfang der auftretenden Stimulierung ist der Größe des entfernten Leberanteiles proportional (WRBA). Für die Beziehung zwischen Regenerationsfaktor nach Hepatektomie und Leberstimulierung besteht strenge Organspezifität. Nephrektomierte Tiere liefern kein leberstimulierendes Serum. Serum teilhepatektomierter Tiere stimuliert andere Organe nicht.

Auch mit heterologen Seren läßt sich die Wirkung an der Leber nachweisen. Serum teilhepatektomierter Mäuse, Ratten und Goldhamster steigert in vergleichbarer Weise den Phosphateinbau sowohl der explantierten embryonalen Rattenleber als auch der Mäuseleber.

Auf die explantierte Niere scheint Blutserum von einseitig nephrektomierten Tieren eine ähnliche Wirkung zu haben. OGAWA und NOWINSKI erzielten durch Zusatz von Blutserum, das von Ratten zwei Tage nach Nephrektomie gewonnen wurde, eine Stimulierung der Mitosenzahl in explantierten Nieren.

Injektion von Leberhomogenat verursachte beim Versuchstier eine meßbare Vermehrung des Einbaues an radioaktivem Phosphat im korrespondierenden Organ (KELLY und JONES). Keine der bisher verwendeten Substanzen aus der Reihe der Wirkstoffe hat eine ähnliche wachstumsfördernde organotrope Wirkung gezeigt wie biogene organspezifische Stimulatoren.

Die Erwärmung im Wasserbad zerstört die Wirkung der stimulierenden Faktoren im Leberbrei (PASCHKIS, TEIR und RAVANTI). Bei der von KALB gewählten Versuchsanordnung, das heißt bei der Explantation embryonaler Leber auf einen Nährboden mit radioaktivem Phosphat, ließ sich ein weiterer für die hier geschilderten Beziehungen bemerkenswerter Befund erheben. Der Zusatz von Leberbrei zu Explantaten dieser Art hatte einen verringerten Einbau an aktiver Substanz im Explantat zur Folge. Daraus könnte man auf eine Hemmwirkung von direkt zugesetztem Organbrei schließen. Hitze-Inaktivierung des zugesetzten Leberbreies hatte zur Folge, daß der Phosphat-Einbau in der Versuchskultur genau dem Einbau in Kontrollkulturen ohne Zusatz von Leberbrei entsprach. Daraus läßt sich ableiten, daß der zugesetzte Organbrei selbst heftig am Phosphatstoffwechsel beteiligt war und durch seine Konkurrenz dem Explantat aktives Phosphat entzogen hat. Bei Verwendung von gefriergetrockneten Leberzellen als Zusatz fand sich ein Anstieg auf den doppelten Wert der Phosphat-Inkorporation im Explantat. Daraus läßt sich schließen, daß die organspezifischen Stimulatoren durch die Gefriertrocknung nicht beeinflußt werden.

Nahezu alle beschriebenen Wirkungen waren unabhängig von der Spezies, jedoch immer auf das homologe Organ beschränkt. Bei der geschilderten Versuchsanordnung unter Verwendung von explantierter Rattenleber erwiesen sich gefriergetrocknete Zellen anderer Tierarten von gleicher Wirksamkeit wie die Zellen der homologen Tierart. Der Kreuzversuch für die Wirkung von Leberhomogenat auf Niere und Herzmuskel zeigte keine Wirkung auf diese Organe (KALB). Von den frühesten Beobachtungen an bestätigte sich das Prinzip der Organspezifität. Homogenate aus Lebern von Meerschweinchen steigerten die Aktivität der Leber der Maus (WILSON und LEDUC). Nach BLOMQVIST wirkt Leberbrei vom Kalb zellteilungsfördernd auf die Leber der Ratte.

Für die Revitalisierung ausgeschalteter Organe durch Zufuhr organspezifischen Materials finden sich im endokrinen Bereich zahlreiche Beispiele. Hier scheint das von HALSTED gefundene Prinzip von besonderer Bedeutung zu sein. So konnten DU BOIS und GONET bei der Ratte nachweisen, daß zugeführte Pankreaszellen ausreichend Insulin produzierten, um beim Tier nach Pankreasentfernung den Blutzucker zu normalisieren. Bemerkenswerterweise kam es unter diesen Bedingungen zu einer intensiven Proliferation von Beta-Zellen im bestehenden Organrest. Hierbei und auch bei der Alloxan-vergifteten Ratte ließ sich durch Bestimmung der Relation von Alpha- zu Beta-Zellen der Befund durch Zählung objektivieren.

Die eigentliche Schwierigkeit für die Bestimmung von Wirkungsbeziehungen der geschilderten Art liegt darin, daß es selten und nur unter günstigen Bedingungen gelingt, den subjektiv eindeutigen Befund objektiv zu fixieren. Erstrebenswert und nur in idealen Fällen erreichbar, ist die Transposition des nachweisbaren Befundes in Zahlen, die eindeutig signifikant sein sollten. Daher das Streben, vereinfachte Versuchsbedingungen – sozusagen Modellversuche – zu entwickeln. Ein Beispiel dieser Art stellt die Versuchsanordnung von WRBA und KALB dar. Das Ergebnis des Versuches zeigt sich dabei in Form von zwei vergleichbaren Zahlen. Auch die Bestimmung von Zellteilungen im Gewebe – durch Auszählung in bezug auf mehrere tausend Zellen eines bestimmten Organes – liefert eine objektive Aussage. Bei der Beurteilung von Wachstumsvorgängen in zwei oder drei Dimensionen wird der Fehler größer, so daß die Statistik der Ergebnisse und die Vermehrung der Versuchszahl erforderlich werden.

Es ist schwer, ein objektives Kriterium zu finden für die Objektivierung von allgemeinen Revitalisierungseffekten. KMENT, LEIBETSEDER und STEININGER konnten im Experiment die revitalisierende Wirkung von Zellinjektionen anhand von verschiedenen Kriterien objektivieren. Es ergab sich, daß die zweimalige Injektion von Placenta-Trockenzellen und von Testis-Trockenzellen in je einer Versuchsgruppe bei Ratten in gewissem Maße das Altern verzögerte. In statistisch signifikanter Weise wurden Zellatmung und Thermokontraktion der Sehnenfäden bei den behandelten Tieren in dem Sinne beeinflußt, daß sie in ihrer Reaktionsweise wesentlich jüngeren Tieren entsprachen.

Für die Placenta hat sich ergeben, daß auch an der explantierten Leber ein wachstumsstimulierender Faktor wirksam wird (Wrba und Kalb).

In diesem Falle erwies sich der Faktor als organunspezifisch wirksam und als thermostabil. Es ist daher naheliegend, zwischen dem unspezifischen Stimulationsfaktor der Placenta und den übrigen organotropen spezifischen Stimulatoren einen gewissen Unterschied zu suchen.

Entscheidend ist für die Bestätigung wachstumsfördernder und hemmender Wirkungen die Auswahl eines kompetenten Bezugssystems. Es ist naheliegend, daß nicht wachsende und auch nicht regenerationsbereite Organe auf derartige Wirkungen nicht reagieren können. So erklärt sich auch, daß gerade die Leber im Mittelpunkt des größten Teiles der Untersuchungen in dieser Arbeitsrichtung steht. Die regenerierende Leber stellt ein Versuchsobjekt dar, das auf eine Vielfalt komplexer Wirkungen reagiert. Nur die Niere ist in ähnlicher Weise in eine Regenerationsphase zu versetzen und hat in dieser Form auch positive Ergebnisse geliefert. Ein großer Teil der beschriebenen Wirkungen ist an wachstumsbereiten embryonalen Organen bestätigt worden. Es scheint, daß explantierte embryonale Organe, die damit einer ganzen Reihe von individuellen immunbiologischen und regulatorischen Wirkungen entzogen sind, besonders geeignete Systeme für die objektive Bestätigung der Wirkung solcher Faktoren darstellen.

Die organspezifische Zellwirkung der Implantation von Kaninchenendometrium auf den Uterus kastrierter Kaninchen

VON P. BERNHARD UND W. KRAMPITZ, DUISBURG-HAMBORN

Im Zusammenhang mit der Zellulartherapie machte P. Bernhard (1956) auf die Implantations-Versuche und die Induktionstheorie von Levander aufmerksam. Bernhard stellte die Frage, ob die Wirkungsweise der Zellulartherapie Parallelen zu den Implantationsversuchen Levanders erkennen lasse. Damit war eine weitere Richtung für die *Grundlagenforschung zur Zellulartherapie* aufgezeigt.

Levander hatte in Tierexperimenten nachgewiesen, daß Implantate von abgestorbenem Organgewebe im umgebenden Mesenchym Reaktionen und Neubildungen gleichartigen Gewebes hervorrufen können, die durch *Induktion* entstehen (s. bei P. Bernhard 1951).

Sicher handelt es sich bei diesen Erscheinungen nicht um ein Weiterwachsen implantierter Zellen oder Zellkomplexe. Levander konnte diese induzierten, organspezifischen Neubildungen auch nach Endometrium-Implantationen beobachten. Er lieferte dadurch einen wichtigen Beitrag zur Genese der Endometriose.

In vielen hundert Versuchen zeigte sich bei subcutanen Implantationen verschiedener Gewebe beim Kaninchen, daß man nur von *dem* Gewebe, das man implantiert, Neugewebe erhält, das heißt also, daß die lokale *Gewebsgeneration organspezifisch* ist.

Levander demonstrierte Bilder von Endometrium-Implantationen, die immer wieder eine Neubildung von endometrioidem Gewebe zeigten.

Das Implantat wurde nekrotisch und die Endometrium-Neubildung erfolgte in der Umgebung des nekrotisch gewordenen Implantates durch Induktion. Ob sich hier auch eine *organotrope «Fernwirkung» auf den Uterus* zeigte, ist nicht untersucht worden.

P. Bernhard (1956) forderte deshalb:

1. Untersuchungen, um die sogenannten *«Endometriosen»* der Levanderschen Experimente als solche zu verifizieren,

2. histologische Untersuchungen darüber, ob Implantate auch auf innere Organe eine histologisch nachweisbare, *organspezifische, organotrope Fernwirkung* haben.

J. BERNHARD (1958) konnte die Versuche LEVANDERS mit Endometrium reproduzieren und nachweisen, daß die Implantation anderer Organgewebe kein endometrioides Gewebe induziert. Er führte diesen Beweis per exclusionem, da Implantate von fetaler Leber, Milz, Lunge, Herz und Placenta keine endometrioiden Neubildungen ergaben.

Es sollte ferner experimentell geklärt werden, ob Organimplantationen auch *organotrope Fernwirkungen* ausüben. So war zum Beispiel zu untersuchen, ob Endometrium-Implantate eine Wirkung auf den Uterus haben.

Diese Experimente würden wesentlich zur Klärung der Wirkungsweise der Zellulartherapie beitragen und ein Beweis für eine organotrope, organspezifische Wirkung auf das Endorgan sein. Der histomorphologische Effekt am Erfolgsorgan würde als Beweis zum funktionellen Effekt nach Frischzellen- oder Trockenzellen-Implantationen von Organgewebe hinzutreten.

Der *Nachweis für die funktionelle Wirkung* ist mehrfach erbracht worden und wird in den folgenden Kapiteln dieses Buches von anderen Mitarbeitern dargestellt (KUHN, KNÜCHEL, NEUMANN, HARBERS, KLEINSORGE-DORNBUSCH).

SCHMID und NEUMANN erbrachten den *Beweis für die organspezifisch-morphologischen Wirkungen* implantierter Zellen und gaben damit auch eine Erklärung der funktionellen Effekte.

Nach Feststellung der morphologischen und funktionellen Effekte der Zell-Implantationen fehlte bisher, soweit bekannt ist, der *Nachweis histologischer Veränderungen* im Endorgan nach Implantation von Organfragmenten.

P. BERNHARD und W. KRAMPITZ haben deshalb tierexperimentelle Versuche zum *histologischen Nachweis einer organotropen Wirkung* uterusferner Endometrium-Implantationen durchgeführt. Die Experimente erfolgten mit Frischzellen- und Trockenzellen-Implantationen.

Zur Einführung in das Problem wird eine kurze Darstellung der lokalen Induktionswirkung von implantiertem Endometriumgewebe (G. LEVANDER und J. BERNHARD) vorausgeschickt.

Es ergab sich folgende Gliederung der Versuchsreihen:

A. Wirkung von *Frischzellen*-Implantationen.

I. Lokale Induktionswirkung (Versuchsreihe 1)

II. Uteropetale, organotrope Fernwirkung auf den Kastratenuterus des Kaninchens.

a) Organspezifische Fernwirkung (Versuchsreihe 2)
13 Tage nach Kastration: Implantation,
22 Tage nach Implantation: Uterusexstirpation.

b) Organspezifische Fernwirkung (Versuchsreihe 3)
51 Tage nach Kastration: Implantation
24 Tage nach Implantation: Uterusexstirpation.

c) Untersuchungen der Frischzellen-Implantate auf Oestrogengehalt.

B. Wirkung von *Trockenzellen*-Implantationen.

a) Organspezifische Fernwirkung (Versuchsreihe 4)
51 Tage nach Kastration: Implantation,
24 Tage nach Implantation: Uterusexstirpation.

b) Untersuchung der Trockenzellen-Implantate auf Oestrogengehalt.

Versuchsreihe 1

Alle Versuche wurden an Kaninchen ausgeführt, und zwar mit vorbehandelten Frischzellen, da LEVANDER mit diesen stärkere Reaktionen als mit vitalen Frischzellen erreichte.

Ein sieben Monate altes Tier wurde am 23. 1. 1958 gedeckt und sollte am 23. 2. werfen. Am 18. 2. erfolgte die supravaginale Uterusamputation. Aus der Uteruswand wurde Endometrium, mit reichlich Deciduazellen und auch muskulösen Anteilen – die nicht ganz vom Endometrium abzutrennen waren – herauspräpariert und auf die Größe von 0,5 mal 0,5 bis 1,0 mal 1,0 cm zugeschnitten. Die Präparate wurden durch 24stündiges Einlegen in 1 %ige wässerige Trypanblau-Lösung gefärbt und hierdurch devitalisiert. Am 19. 2. erfolgte die Implantation. Das Gewebe war nach der Behandlung mit Trypanblau diffus gefärbt.

Dieses «*moriente Gewebe*» (P. BERNHARD) wurde an zwei Stellen in die Subcutis der Rückenhaut des uterusexstirpierten Tieres implantiert. Außerdem wurden bei zwei weiteren Tieren je vier Implantationen vorgenommen. Beide Tiere waren 6–7 Monate alt und waren noch nicht trächtig (autologe und heterologe Implantationen).

Am 6. 3., also 14 Tage nach der Implantation, wurde der gesamte Implantationsbezirk in toto entfernt und in 10%igem Formalin fixiert. Dieser Zeitpunkt wurde deshalb gewählt, weil die LEVANDERschen Präparate zu dieser Zeit die deutlichsten Differenzierungen aufwiesen.

Der Chefpathologe der Ruhrknappschaft, Prof. Dr. HUSTEN, schnitt und deutete die histologischen Präparate. Anschließend wurden von einer Reihe der Präparate Mikrophotogramme und Diapositive angefertigt.

Die histologische Untersuchung ergab folgende Bilder:

Abbildung 84 gibt eine Übersicht. Das Transplantat ist durch die intensive Blaufärbung charakterisiert. Der diskusartige, unregelmäßig begrenzte Körper ist nekrotisch. Er liegt zwischen Faszie und Muskulatur; um ihn herum befindet sich zelliges Gewebe, das offenbar neu gebildet wurde. Eine Verbindung des Transplantates mit den neu gebildeten Randzonen besteht nur an einer Stelle. Die wichtigen Neubildungen zeigen sich aber dort, wo sowohl die Faszie als auch das Organisationsgewebe durch einen Spalt vom Transplantat getrennt sind.

Löst man diese Schichten im einzelnen auf, so sieht man, daß sich in die nekrotischen Massen des Transplantates viele Leukocyten eingeschoben haben. Auch große Deciduazellen mit tiefblauer Färbung sind noch vereinzelt zu erkennen. An geeigneten Stellen sieht man auf der Faszienseite die Entwicklung einer zellig-bindegewebigen Zone, die sich mit unscharfer Grenze in das Transplantat einschiebt. Dabei haben die Bindegewebszellen zum Teil auch Trypanblau in einer körnigen Form gespeichert.

Die Gegenseite, die Muskelseite des Transplantatlagers, zeigt eine Zone zelligen Granulationsgewebes mit wechselndem Gehalt an Kapillaren. In dieser Zone kommen muskelnah viele Bindegewebsabkömmlinge vor, eosinophile Leukocyten und auch Zellen, die Trypanblau gespeichert haben. Nähert man sich dem Transplantat weiter, so kommt die Schicht des umgebenden Mesenchymrings zum Ausdruck, die an Kapillaren sehr arm ist. In ziemlich großen Gesichtsfeldern sind überhaupt keine Gefäße zu sehen. Das Zellgut ist hier leicht verstreut. Es handelt sich um bindegewebige Zellen von langgestreckter Form. Dann treten plumpe, polymorphe Zellen auf, die reichlich Trypanblau enthalten. Diese binde-



Abbildung 84 1:50

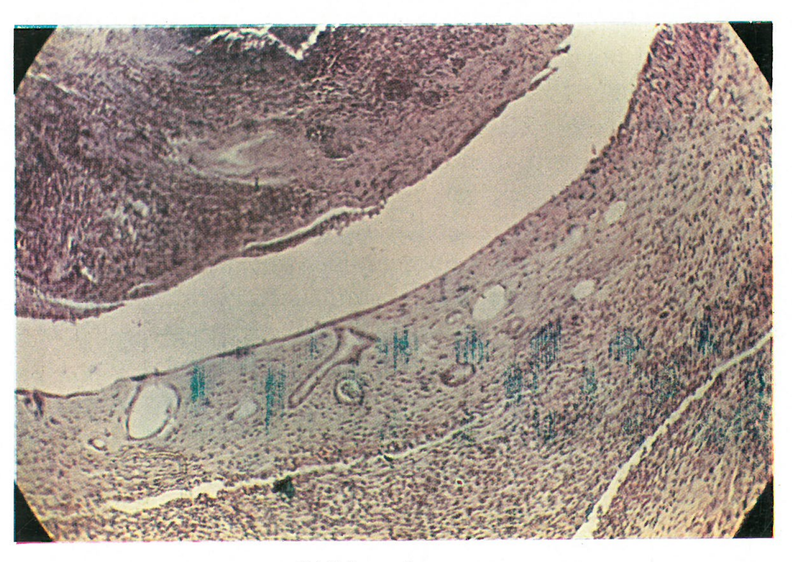


Abbildung 85 1:300

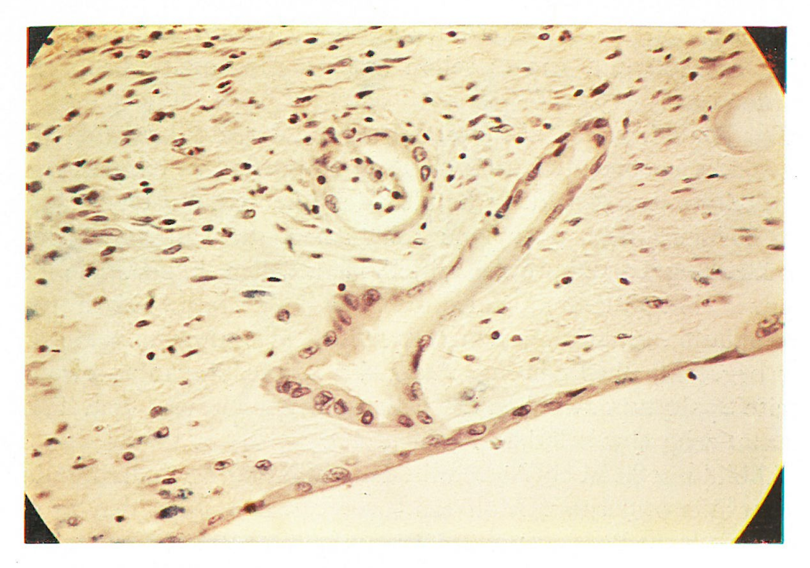


Abbildung 86 1:1500

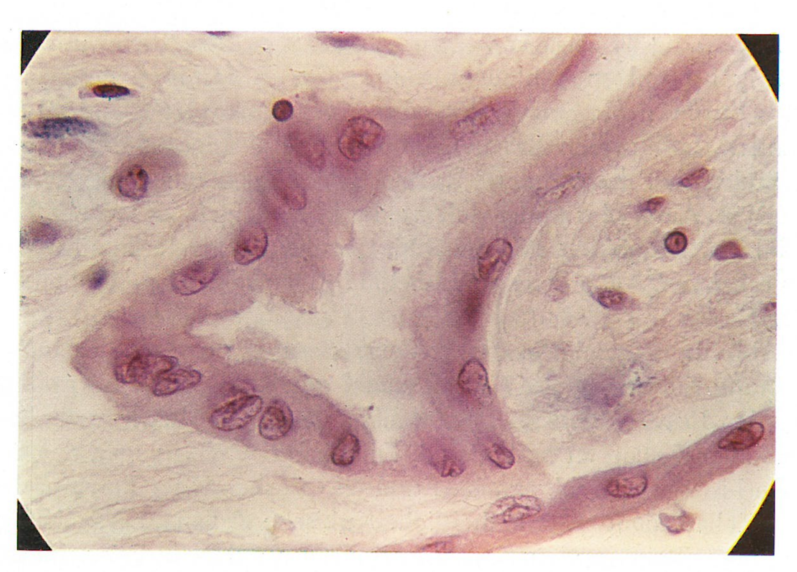


Abbildung 87 1:3200

gewebige Zone verliert sich mit unscharfer Grenze in das nekrotische Transplantat, wie es schon auf der Gegenseite beobachtet worden ist.

Das Bemerkenswerte ist nun, daß sich in der kapillararmen Zone des bindegewebigen Mantels Hohlräume vorfinden, die teils rundlich, teils gestreckt sind. Es handelt sich offenbar um Querschnitte von kleinen Cysten oder auch Schläuchen, die eine einschichtige Auskleidung von plumpen, mittelhohen Zellen haben. Die Zellgrenzen sind oft kaum nachweisbar. Die Zellen selbst haben trübes Protoplasma und umranden teils scharf, teils unregelmäßig wolkig begrenzt, die Lichtung. Auch der bereits eingangs erwähnte breite Spaltraum zwischen der zellarmen Schicht und dem Transplantat zeigt eine zelluläre Auskleidung.

Abbildung 85 ist ein Ausschnitt der Abbildung 84 in dreihundertfacher Vergrößerung. Man sieht vor allem wieder den großen Spalt als klare Begrenzung des Transplantates. Im mesenchymatösen Ring des Organisationsgewebes werden die kleinen Cysten und Schläuche deutlicher. Die Auskleidung der Cysten besteht aus einer Reihe epitheloider Zellen. Diese sind nicht einheitlich geformt. Sie sind von verschiedener Höhe und Breite, weisen also eine ausgesprochene Polymorphie auf.

Abbildung 86 zeigt in Vergrößerung 1:1500 eine dieser unregelmäßig begrenzten, schlauchförmigen Cysten inmitten des zellarmen Stromas. Ein einreihiger, epithelial anmutender Zellsaum mit runden, teils ovalen Kernen, umschließt die Lichtung. In dieser befinden sich desquamierte Zellen, die wahrscheinlich abgestoßen wurden. Auch hier findet sich wieder in einzelnen Zellen das Trypanblau. Im oberen Teil des Bildes ist der Rand des Spaltsaumes zu erkennen. Auch er zeigt epitheliale Zellauskleidung, ähnlich der der Cysten.

Abbildung 87 zeigt in starker Vergrößerung von 1:3200 die in Abbildung 86 dargestellte Cyste. Scharf gezeichnet sind die großen, runden Kerne, die mehr oder weniger zentral in den mittelhohen, kuboiden Zellen zu finden sind. Die Zellgrenzen – gegen das Lumen hin – sind weniger scharf und entsprechend der Polymorphie der Zellen nicht ganz einheitlich. Kubische Zellen aber, mit zentral gestellten, runden Kernen, erinnern an das Endometriumgewebe und lassen eine gewisse morphologische Übereinstimmung

deutlich werden. Betrachtet man den linken oberen Teil des Bildes, so findet man Bindegewebszellen mit einer körnigen Speicherung des blauen Farbstoffes. Da aber diese Speicherzellen dem neu gebildeten Mesenchym angehören, kann man folgern, daß Teile des Organisationsgewebes Stoffe aus dem Transplantat aufgenommen haben; der Nachweis des Trypanblau in den Zellen berechtigt zu dieser Annahme.

Prof. HUSTEN schrieb die Legende zu allen Präparaten, da ein sicheres objektives Fachurteil über die Ergebnisse der Tierversuche vorliegen sollte: «Das mit Trypanblau angefärbte Transplantat des Schwangerenuterus wird nekrotisch und organisiert. Dabei tritt eine Resorption von Farbstoff in die bindegewebigen Zellen des Organisationsgewebes auf. Dieses enthält neben Leukocyten und Bindegewebsabkömmlingen auch Speicherzellen mit Trypanblau.

Ein schmaler Streifen, dem Transplantat nahe gelegen, ist zellarm und auch arm an Kapillaren. In diesem Streifen finden sich drüsig anmutende Formationen in Form von Cysten und Gängen. Soweit sich in der engen Nachbarschaft des Transplantates ein Spaltraum im Gewebe gebildet hat, hat auch dieser einen Saum von epithelial anmutenden Zellen. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß es sich um einen *Induktionseffekt* des Transplantates aus Schwangerschaftsdecidua handelt» (HUSTEN).

Nach Feststellung dieses Induktionseffektes *rein örtlich in der Umgebung des Implantates sollten weitere Untersuchungen* die organotropen Wirkungen eines Frischzellenimplantates darstellen. Es ergaben sich folgende Fragen:

1. Welches Bild zeigt das normale Endometrium eines nicht graviden Uterus?
2. Welche Veränderung des Endometriums beim Kaninchen zeigt sich nach Kastration? Ist eine Atrophie nachzuweisen?
3. Welchen Einfluß hat die subcutane Implantation von Endometrium auf diese regressiven Veränderungen des Endometriums des Kaninchens?

Versuchsreihe 2

Es wurden kleine Stückchen von $^1/_2$ bis 1 cm³ Endometrium eines trächtigen Kaninchens am 18. Tage der Trächtigkeit in die Unterhaut zweier 13 Tage vorher kastrierter Jungtiere implantiert.

Bei dem einen Jungtier wurde ein Stückchen Uterus vor der Kastration entfernt, um die normale Mucosa zu studieren. Beim anderen Jungtier wurde – um die mutmaßlichen Vorgänge der Atrophie der Mucosa studieren zu können – ein Stückchen Uterus am 13. Tage nach der Kastration entfernt. *22 Tage* nach der Implantation wurden die Tiere getötet, die Implantate und die Uteri wurden exstirpiert und zur Untersuchung dem Histologen übergeben. Folgende Bilder zeigen den Uterus vor und nach der Kastration und nach Implantation von Schwangerschaftsdecidua:

1. Normaler Uterus vor der Kastration (Abbildung 88)

Man sieht außen das Myometrium, nach innen darunter die Schleimhaut mit Falten, die nur noch eine sternförmige, unregelmäßige, freie Lichtung lassen. In den Schleimhautfalten sieht man zahlreiche Kapillaren; oberflächennahe liegt das Zellgut des Stroma der Schleimhaut. Eingesenkt sind zahlreiche Drüsen, die ganz vereinzelt in der Tiefe eine geringe Erweiterung aufweisen.

Abbildung 89 gibt eine deutlichere Darstellung (Vergrößerung 1:300) der lichtungsnahen Anteile der Schleimhaut mit den Falten (vergleiche Abbildung 88).

Abbildung 90 zeigt in Vergrößerung 1:1500 die lichtungsnahen Anteile der Schleimhaut mit den *eingesenkten Drüsen.* Die Stromazellen sind recht locker angeordnet.

2. Uterus nach der Kastration (Abbildung 91)

Die Muscularis des Uterus ist erhalten. Die Uterusschleimhaut ist in Falten gelegt. Das Stroma ist dichtzellig bindegewebig. Die lichtungsnahe Schicht des Stromas der Schleimhaut ist besonders zellreich. Die sternförmige Lichtung ist weiter als beim Uterus vor der Kastration. Die Zellen der Innenauskleidung des Uterus sind dunkler, kleiner, flacher. *Es fehlen die eingesenkten Drüsen der Schleimhaut völlig.* Die Kapillaren der Schleimhaut sind enger als vor der Kastration.

Abbildung 92 zeigt die lichtungsnahen Anteile der Falten der Uterusschleimhaut in Vergrößerung 1:300.

Abbildung 93 zeigt, 1:1500 vergrößert, das besonders zellreiche bindegewebige Stroma. Die Auflockerung des Stromas vor der Kastration ist nicht zu sehen.



Abbildung 88 1:50

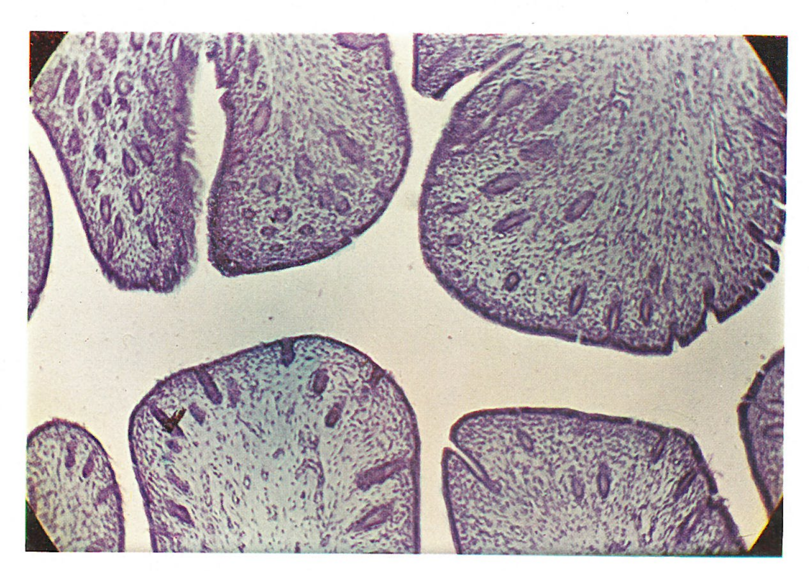


Abbildung 89 1:300

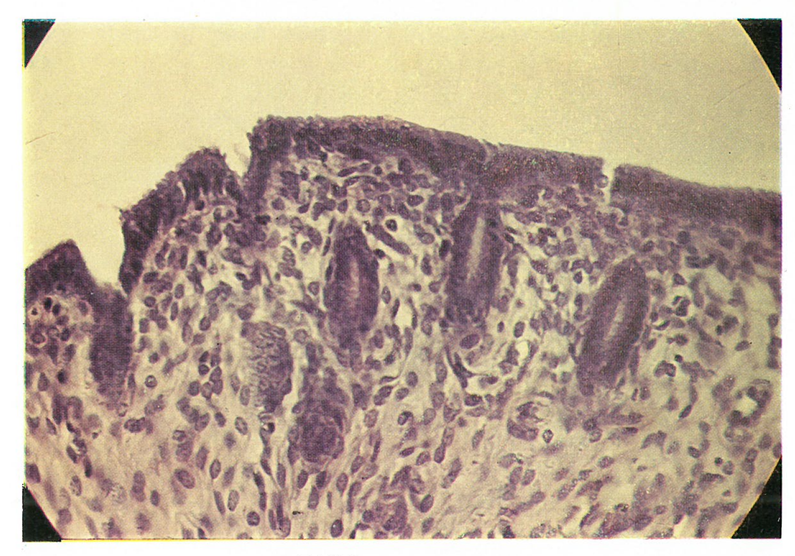


Abbildung 90 1:1500



Abbildung 91 1:50

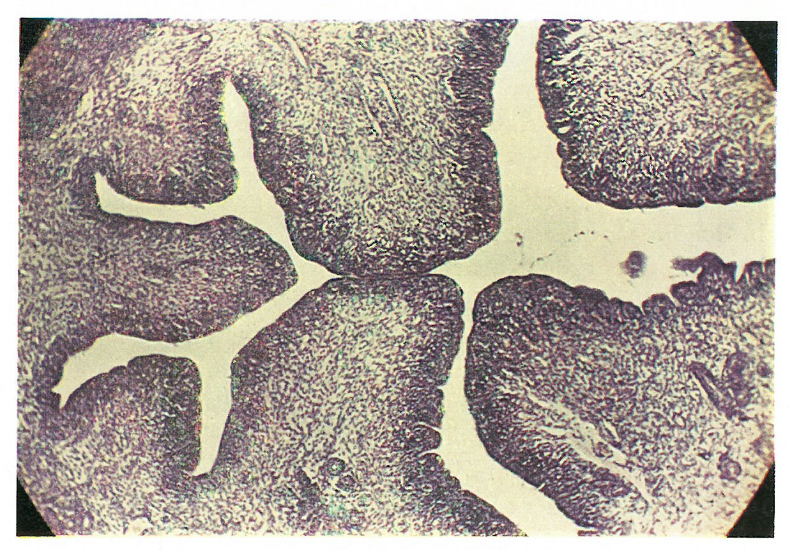


Abbildung 92 1:300

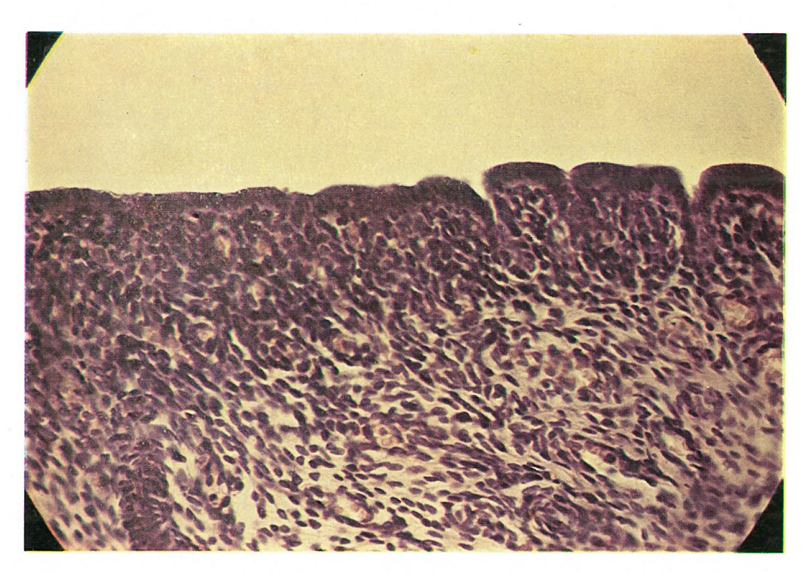


Abbildung 93 1:1500

Man sieht in Anlehnung an den Schleimhautüberzug um die Lichtung stellenweise ganz *flache Grübchen an Stelle der zurückgebildeten, eingesenkten Drüsenschläuche.*

3. Kaninchenuterus nach Kastration und Implantation von Schwangerschaftsdecidua (Abbildung 94)

Der Querschnitt des Uterus erscheint im ganzen wieder größer als in den Präparaten 13 Tage nach der Kastration (Abbildung 91) und sogar etwas größer als in den Präparaten vor der Kastration (Abbildung 88). Die sternförmige Lichtung des Uterus ist im ganzen wieder enger. Das Schleimhautstroma ist nicht so zelldicht wie nach der Kastration. Die bindegewebigen Zellen des Stromas sind größer und nehmen angedeuteten Deciduacharakter an. Die Kapillaren sind weiter. Das Epithel, das die Drüsenlichtung umkleidet, hat einen deutlichen Zylinderepithelcharakter angenommen. Es ist höher und lichter als nach der Kastration und auch höher als vor der Kastration. Es sind *Schläuche des drüsigen Epithels eingesenkt, die hohes lichtes Epithel* tragen. Sie sind nicht ganz gleichmäßig in ihrer Anordnung. Die unmittelbar begleitenden Stromazellen sind größer.



Abbildung 94 1:50

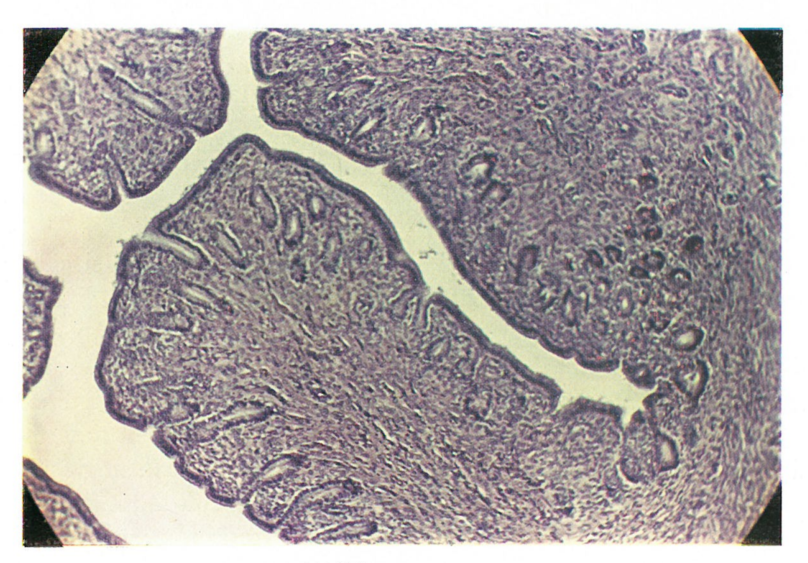


Abbildung 95 1:300

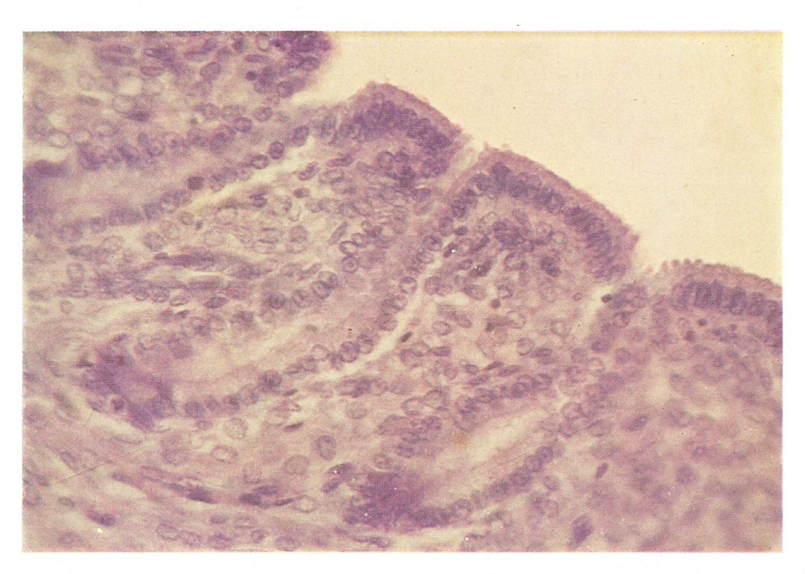


Abbildung 96 1:1500

Abbildung 95 gibt diese Befunde bei mittlerer Vergrößerung von 1:300.

Abbildung 96 zeigt das aufgelockerte deciduale Stroma und das Oberflächenepithel der Schleimhaut und auch die *eingesenkten Drüsen mit ihrem hohen Epithel* besonders deutlich bei Vergrößerung von 1:1500.

Prof. HUSTEN deutet die Bilder:

«Nach Kastration findet sich eine Rückbildung der Schleimhaut. Der Turgor des Gewebes läßt nach. Als Zeichen dessen findet sich ein zelldichtes Stroma der Schleimhaut und niedriges drüsiges Epithel um die Lichtung. Vor allem aber ist eine Rückbildung der eingesenkten Drüsen der Schleimhaut im Stroma zu verzeichnen, so daß man als Andeutung der früher bestehenden Drüsen nur noch die Form von Grübchen in der Schleimhaut um die Lichtung findet.

Nach Implantation von Schwangerschaftsdecidua nähert sich das Bild wieder dem normalen vor der Kastration, aber vor allen Dingen mit dem Unterschied, daß sich wieder die Drüsen der Schleimhaut von den Grübchen aus in großer Zahl eingesenkt haben.

Dazu ist das Stroma wieder lichter infolge Vergrößerung der bindegewebigen Stromazellen, die ihrerseits einen deciduaartigen Charakter angenommen haben. Zudem ist das Drüsenepithel um die Schleimhautlichtung in den Drüsen wieder recht hoch bei basalstehenden Kernen.»

Nach diesen Versuchen mit «morienten» Frischzellen, mit einer Kastrationszeit von 13 und einer Implantationszeit von 22 Tagen haben wir einen weiteren Versuch mit Frischzellen angesetzt. Wir haben die Implantation an Kaninchen vorgenommen, die *51 Tage* kastriert waren, um ganz sicher ein funktionsloses Endometrium zu haben.

CLAUBERG hielt 1931 eine Kastrationszeit von 28 Tagen für erforderlich, um mit Sicherheit ein funktionsloses Endometrium beim Kaninchen zu erzielen. Wir überschritten diese Zeit bewußt, um absolut sicher zu gehen. Wir kastrierten vier Kaninchen und implantierten dem ersten Tier Frischzellen (Versuchsreihe 3) und den drei weiteren Trockenzellen (Versuchsreihe 4) von Kaninchen-Endometrium. Die Tiere wurden am 24. Tage nach der Implantation getötet und die Uteri zur Untersuchung gebracht.

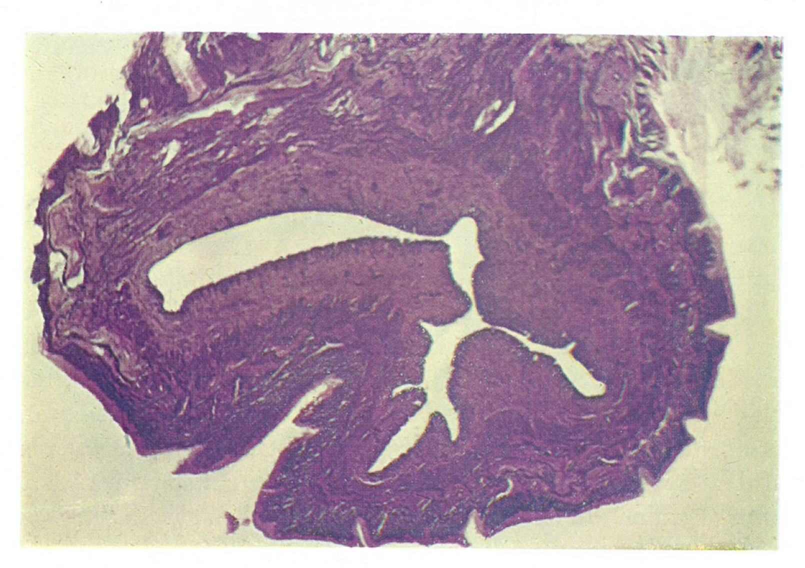


Abbildung 97 1:50

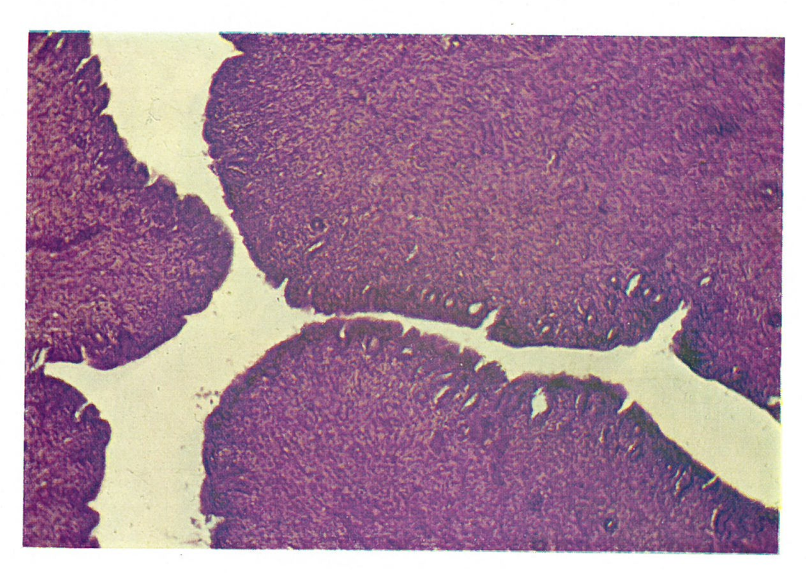


Abbildung 98 1:300

Versuchsreihe 3

Von 4 kastrierten Kaninchen wurden einem Tiere 3 Implantate Uterus mit decidualem Endometrium wie in Versuchsreihe 2 eingepflanzt. Nach 24 Tagen wurde das Tier getötet und der Uterus herausgenommen.

Betrachtet man in Vergrößerung 1:50 die folgenden Bilder der Uteri 1–4 (Abbildungen 97, 101, 104, 107), so fallen diese zunächst durch eine Gleichartigkeit auf: sie sind geschrumpft.

Abbildung 97: Die erste Übersichtsaufnahme 1:50 zeigt einen stark geschrumpften Uterus. Sämtliche Schichten sind zwar erhalten, aber kompakter geworden. Muscularis und Bindegewebe heben sich deutlicher gegen die hellere Mucosa ab. Die sonst gleichmäßig sternförmige Lichtung ist unregelmäßig geworden. Drüsen sind auf den ersten Blick nicht zu erkennen. Erst bei stärkerer Vergrößerung kommen in den lichtungsnahen Bezirken *einwandfreie Drüsen* heraus.

Abbildung 98 zeigt einen Ausschnitt aus dem oberen Lichtungszipfel der vorigen Aufnahme in Vergrößerung von 1:300. Lich-

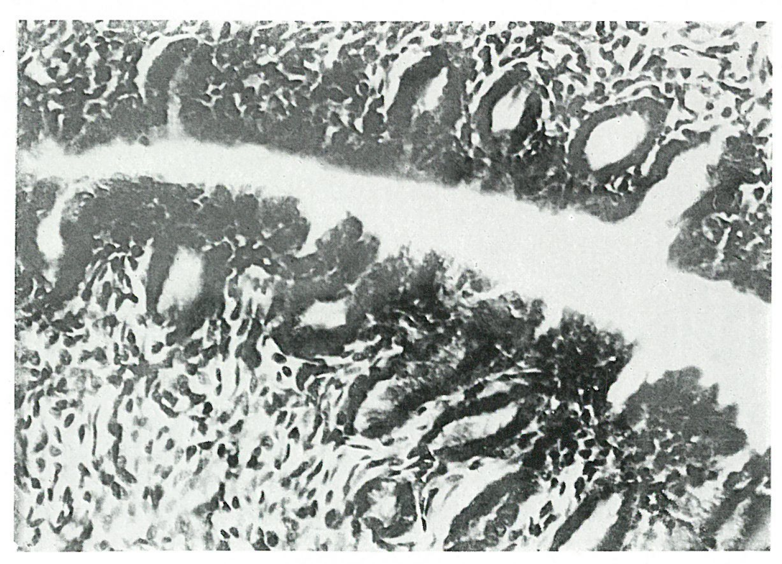


Abbildung 99 1:1500

tungsnah, dicht aneinandergereiht sind kurze plumpe Drüsen mit relativ weitem Lumen zu erkennen. Lichtungsfern liegen keine Drüsen. Das Stroma besteht kompakt aus dichtstehenden, spindelförmigen Zellen.

Abbildung 99 zeigt die beschriebenen Drüsen, 1:1500 vergrößert.

Wenn man sich nun fragt: Sind diese Drüsen von der ursprünglich proliferierten Schleimhaut zurückgeblieben, oder sind es neue Drüsen, so sollen zum Vergleich die Abbildungen 91–93 herangezogen werden. Abgebildet ist der Querschnitt eines Uterus 13 Tage nach Kastration. Schon zu jenem Zeitpunkt ließ dieser Uterus keine einzige Drüse mehr erkennen. Eine Implantation von «morienten» Frischzellen vom Endometrium verwandelte diese drüsenlose Schleimhaut in ausgesprochenes Proliferationsendometrium.

Obwohl es nur wenige Versuche sind, ist vielleicht dennoch folgender Schluß erlaubt: Wenn schon 13 Tage nach Kastration eine Schleimhaut bei sonst gut erhaltener anatomischer Struktur keine Drüse aufweist, wie weit muß die *Atrophie erst 51 Tage nach Kastration* fortgeschritten sein. Sicher ist, daß man zu diesem Zeitpunkt erst recht keine Drüsen mehr erwarten darf.

Dennoch finden sich 24 Tage nach Implantation von Endometrium-Frischzellen und insgesamt 75 Tage nach Kastration wieder Drüsen! Nach dem vorher Gesagten ist es unwahrscheinlich, daß diese Drüsen nach der Kastration übrig geblieben sind. Nach CLAUBERG ist ein Kaninchenuterus 28 Tage nach der Kastration so weit zurückgebildet, daß keine Drüsen, keine Anzeichen einer Proliferation mehr zu erkennen sind. Somit können die – wenn auch nur spärlichen – Drüsen nur ein Effekt des Implantates sein.

Als Ergebnis dieses Versuches ist festzustellen, daß *nach Implantation von Uterus mit decidualem Endometrium eine ruhende Schleimhaut in eine* Proliferationsphase gebracht wurde.

Ist dies nun eine organspezifische Zellwirkung oder eine hormonale Wirkung? Man könnte unterstellen, daß der Uterus einen besonders hohen Gehalt an Hormonen aufweise und das Follikelhormon hierbei die Proliferation verursache. Es war in unserer Versuchsreihe 2 allerdings nach der Kastration keine ausgesprochene Atrophie der Schleimhaut eingetreten, sondern nur ein Ruhezustand. Die Kastration lag auch noch nicht lange zurück *(13 Tage)*. In der Versuchsreihe 3 aber betrug die Kastrationszeit *51 Tage*, und

dennoch wurde eine drüsenhaltige Schleimhaut am *24. Tage* nach Implantation von Endometrium-Frischzellen gefunden.

Man muß daher fragen, ob die Frischzellen-Implantate nicht als Hormon-Depots einen Aufbau der Schleimhaut bewirkt haben. Man müßte also diejenige Menge Follikelhormon kennen, die beim kastrierten Kaninchen eine Proliferationsphase auslöst. Nach CLAUBERG beträgt diese Menge am Beispiel des Progynon (Schering) 105 ME (Mäuseeinheiten). Eine Mäuseeinheit ist die Menge Follikelhormon, die bei kastrierten Mäusen einen Oestrus hervorruft; wieder am Beispiel des Progynon sind dies etwa 1 Gamma = ein Tausendstel mg. Beim Kaninchen wären also 105 ME = 105 Gamma zur Auslösung einer Proliferation erforderlich. Kann man annehmen, daß in den verwendeten Implantaten so viel Follikelhormon gewesen ist?

Jedes Kaninchen hatte 3 Implantate von je etwa 1 cm^3 bekommen. Ein Implantat wog im Durchschnitt 0,1 Gramm. Jedes Kaninchen erhielt also 0,3 (höchstens 0,5 g) Uterus-Substanz. Das sind 120 mg bis höchstens 200 mg/kg Körpergewicht. Wieviel Follikelhormon könnte dem Kaninchen mit den Implantaten zugeführt worden sein?

Privat-Dozent Dr. NEUMANN vom Institut für Biologische Forschung in Köln hat sich dieser Frage angenommen und folgende Untersuchung durchgeführt.

Prüfung des Oestrogengehaltes in Uterusschleimhaut gravider Kaninchen

«Zur Überprüfung des Oestrogen-Gehaltes in der Uterusschleimhaut gravider Kaninchen wurden zwei im 25. bzw. 26. Tage der Gravidität stehende Häsinnen durch Nackenschlag getötet. Es wurde der Uterus unter sterilen Bedingungen entnommen, eröffnet und das Endometrium in Form schmaler Streifen abgelöst. Das gewonnene Gewebe wurde gewogen und mit einer scharfen Schere rasch zerkleinert. Dann wurde es in Ringerlösung aufgeschwemmt und insgesamt 8 ovariektomierten Mäusen eine Menge von je 160 mg/kg intramuskulär injiziert.

Allen Versuchen lag die bekannte Untersuchungsmethode nach ALLEN und DOISY zugrunde, nach welcher das Auftreten von Schollen im Vaginalabstrich kastrierter Tiere kennzeichnend für den Oestrogengehalt einer applizierten Substanz ist. Um auch An-

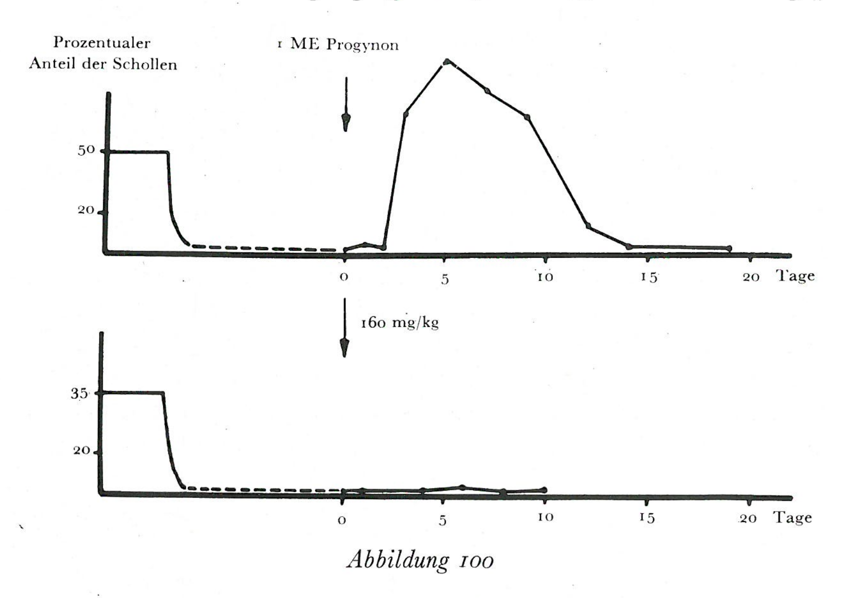


Abbildung 100

sätze zu einer Verhornung des Vaginalepithels erfassen zu können, wurde der prozentuale Anteil der Schollen im Ausstrich durch Schätzung ermittelt.

Die Tiere waren vor der Injektion mit Abstrichen auf Vollständigkeit der Ovariektomie geprüft worden. Nach der Injektion wurden in zweitägigen, später in dreitägigen Abständen erneut Abstriche vorgenommen und mikroskopisch ausgewertet.

In dem zur Beobachtung stehenden Zeitraum konnte ein Ansteigen der Schollenzahl bei den 8 kontrollierten Mäusen nicht beobachtet werden. Es ist also in lebensfrisch gewonnenem Endometrium tragender Häsinnen *keine oestrogene Substanz* nachzuweisen.» (Abbildung 100)

Wir ersehen aus diesem Versuch, daß auch in den Implantaten keine nennenswerte, mit biologischen Methoden erfaßbare Menge Follikelhormon gewesen sein kann. Die verabreichten Mengen an Uterussubstanz (als Frischzellen) liegen bei den Mäusen und Kaninchen in der gleichen Größenordnung: bei den Mäusen 160 mg/kg, bei den Kaninchen 120–200 mg/kg. Damit soll nicht gesagt sein, daß Mäuse und Kaninchen mit einer adäquaten Menge Follikelhormon pro kg Körpergewicht in den Oestrus bzw. eine Proliferationsphase zu bringen sein müssen. Die Ansprechbarkeit kann

natürlich sehr unterschiedlich sein. Da man aber keinen empfindlicheren biologischen Test hat als den von ALLEN-DOISY, hätten doch geringste *Mengen nachweisbar sein müssen, falls sie vorhanden waren.*

Auch das Pharmakologische Laboratorium der «Farbwerke Hoechst AG» führte am hochgraviden Kaninchenuterus orientierende Oestrogenbestimmungen aus, die ebenfalls *negativ* verliefen.

Somit ist es unwahrscheinlich, daß die beschriebenen Veränderungen, wie sie sich bei unserem ersten Versuch ergaben, durch eine hormonale Wirkung ausgelöst wurden. Eine körpereigene Hormonwirkung ist ebenfalls ausgeschlossen, weil das Tier einwandfrei kastriert war. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist also eine *organspezifische Fernwirkung der implantierten Endometrium-Frischzellen auf den Uterus des kastrierten Kaninchens anzunehmen.*

In der

Versuchsreihe 4

wurden statt der «morienten» Frischzellen vom Endometrium Implantationen von Endometrium-Trockenzellen des Kaninchens implantiert, die die Firma «Rhein-Chemie», Heidelberg, im Lyophilisierungsverfahren herstellte.

Interessanterweise ist die organotrope, organspezifische Fernwirkung auf den Kastratenuterus des Kaninchens die gleiche wie nach Frischzellen-Implantationen. Die drüsigen Formationen in der wiedererweckten Schleimhaut sind von der gleichen Größe.

Daß die Drüsenbildungen in den Versuchsreihen 3 und 4 dürftiger ausfallen als in der Versuchsreihe 2 muß auf die länger zurückliegende Kastration zurückgeführt werden. In der Versuchsreihe 2 war die Atrophie eben noch nicht so weit fortgeschritten.

Es wurden drei 51 Tage vorher kastrierten Kaninchen Endometrium-Trockenzellen injiziert, und zwar je 2 Ampullen zu 45 mg Substanz. Die Uterusexstirpation erfolgte am 24. Tage nach Implantation.

Die *Ergebnisse* gehen aus folgenden Mikrophotogrammen hervor:

1. Tier (Abbildungen 101–103)

Abbildung 101: Der Uterus ist etwas schräg geschnitten. Die Atrophie geht hier noch weiter als in Abbildung 97 (gleiche Vergrößerung!). In der Relation zwischen Wandung und Lichtung er-

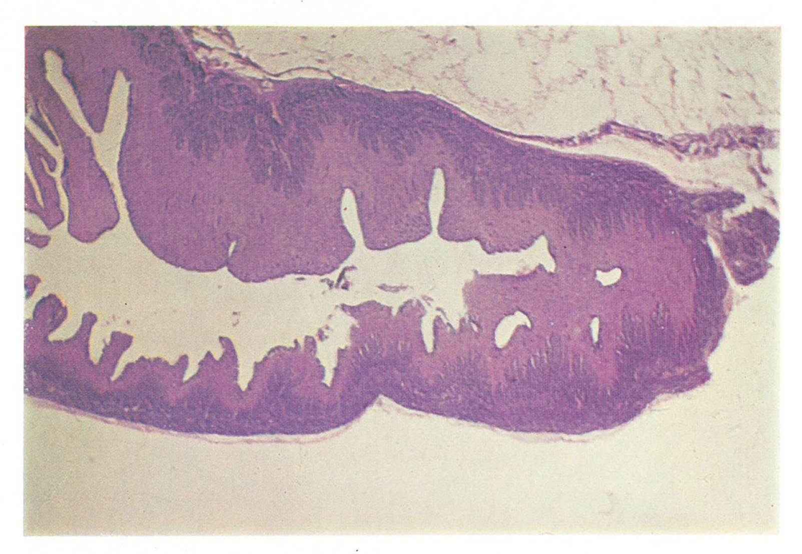


Abbildung 101 1:50

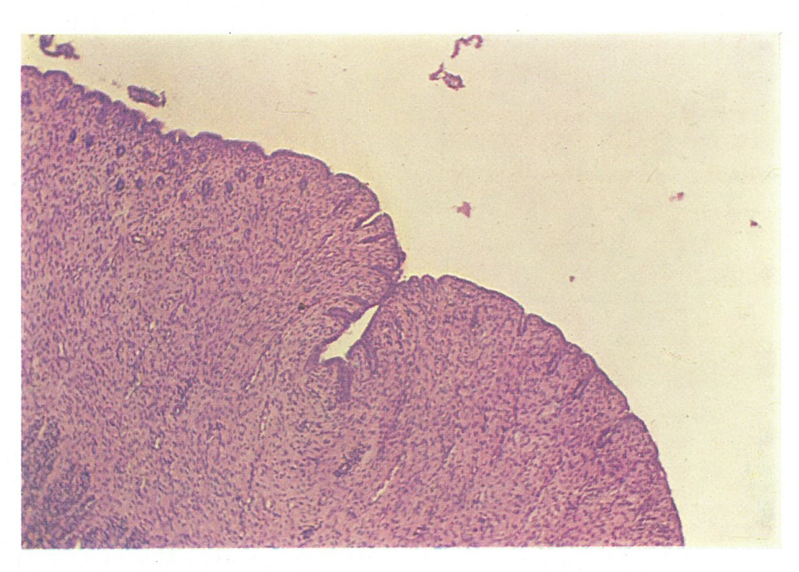


Abbildung 102 1:300

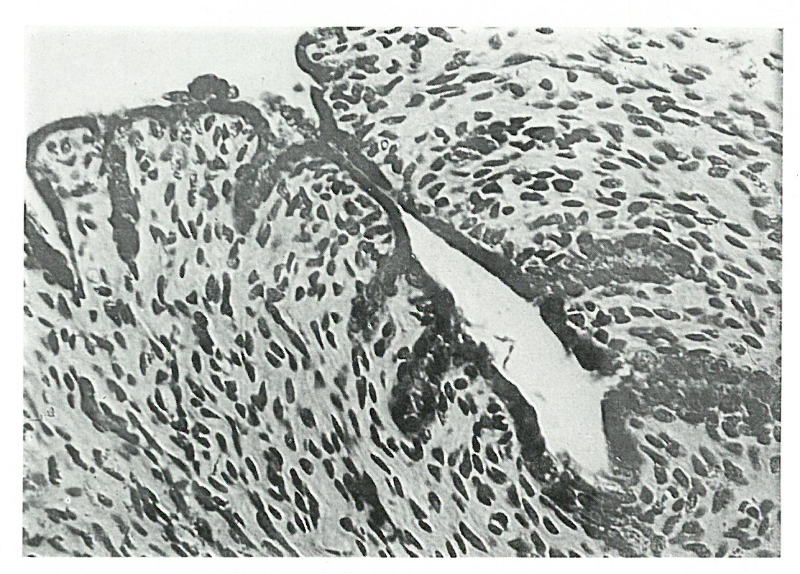


Abbildung 103 1:1500



Abbildung 104 1:50

scheint letztere durch die Schrumpfung besonders weit. Eine Schleimhautfalte läßt lumenwärts eine pünktchenförmige Zeichnung erkennen – Querschnitte von engen Drüsen.

Abbildung 102 zeigt diese Drüsen deutlicher. In einer Schleimhautfalte sind Drüsen im Längsschnitt getroffen. Sie reichen nicht sehr tief und haben das gleiche Kaliber wie die quer getroffenen.

Abbildung 103: Die längsgetroffenen Drüsen sind stärker vergrößert und befinden sich im Ruhestadium. Das Stroma ist dichtzellig.

2. Tier (Abbildungen 104–106)

Abbildung 104: Der Uterus ist flach zusammengesintert und zeigt nur angedeutete Falten. Das Lumen ist nicht mehr sternförmig, sondern langgestreckt (einwandfreier Querschnitt!).

Abbildung 105: An einem Ende des Lumens finden sich einige Drüsen, die sich etwas weiter einsenken als in den vorigen Aufnahmen.

Abbildung 106: Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Drüsen etwas weiter; sie sind zum Teil tangential geschnitten. Das Stroma ist dicht.

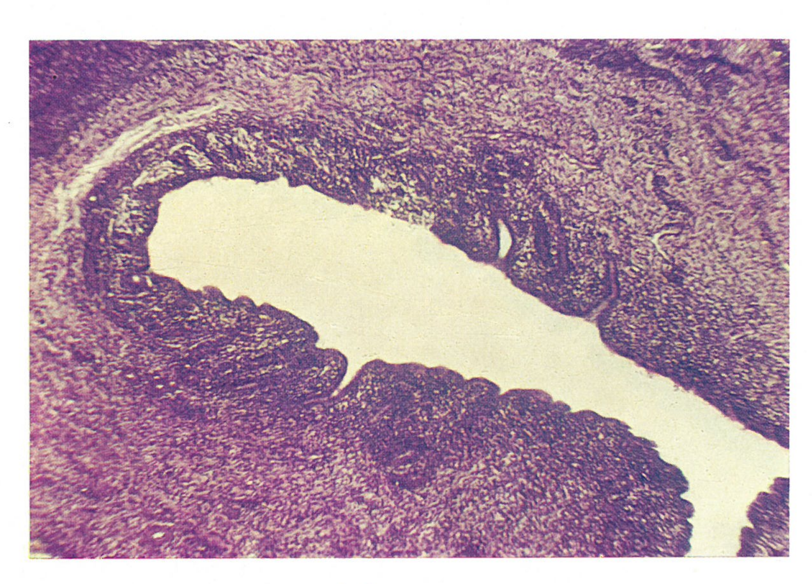


Abbildung 105 1:300

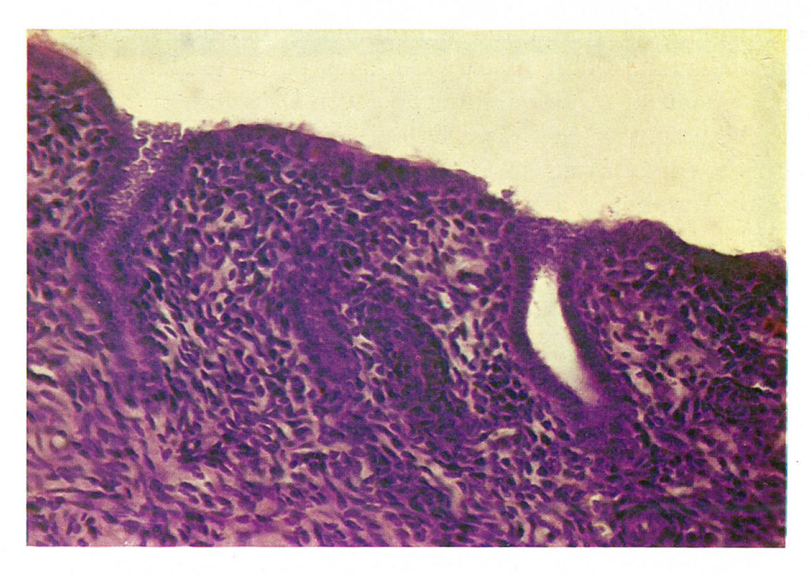


Abbildung 106 1:1500



Abbildung 107 1:50

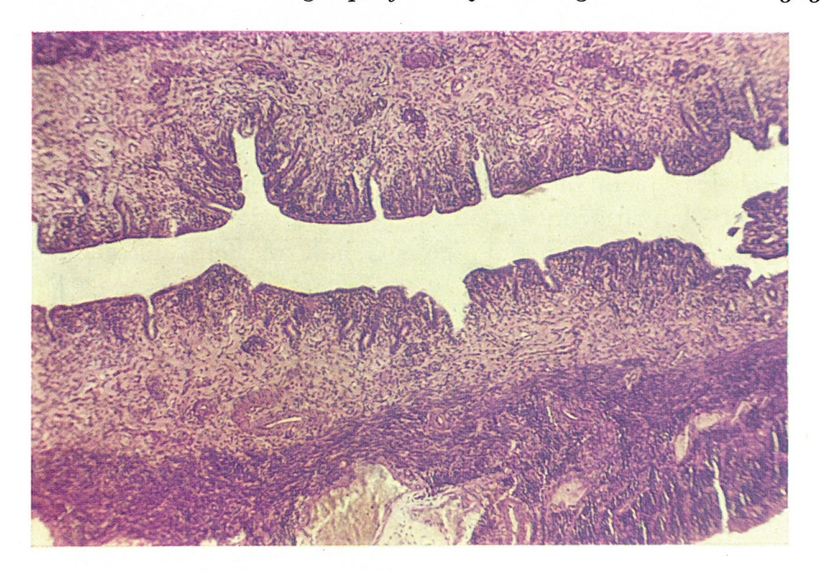


Abbildung 108 1:300

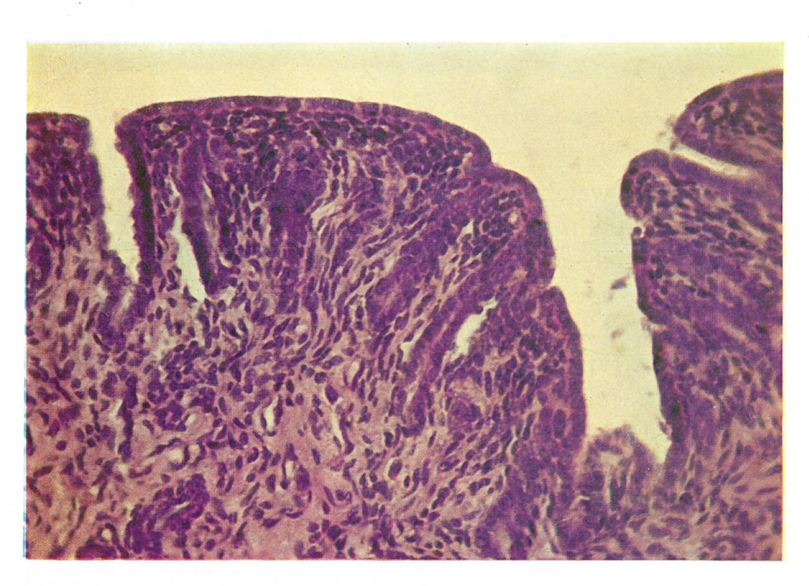


Abbildung 109 1:1500

3. Tier (Abbildungen 107–109)

Im wesentlichen finden sich in den Abbildungen 107–109 die gleichen Befunde wie bei den vorigen Tieren 1 (Abbildungen 101–103) und 2 (Abbildungen 104–106).

Auch hier bleibt noch die Frage nach dem Hormoneffekt der Trockenzellen zu beantworten. NEUMANN hat daher auch die Endometrium-Trockenzellen auf deren Gehalt an Follikelhormon untersucht:

Fragestellung

Es sollte festgestellt werden, ob in übergebenen Ampullen eines Präparates «Endometrium» (Siccacell-Präparat der Firma Rhein-Chemie) oestrogenes Hormon enthalten ist. Im Falle positiver Ergebnisse sollte versucht werden, Aussagen über die ungefähre Menge des Hormons zu machen.

Allgemeine Anordnung der Versuche

Zur Bestimmung des Oestrogengehaltes in Siccacell-Präparaten «Endometrium» wurden in zeitlichem Abstand von einigen Wochen zwei Versuchsreihen an zusammen 14 bilateral ovariektomierten Mäusen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden wiederum nach der Methode von ALLEN und DOISY durchgeführt.

Prüfung des Oestrogen-Gehaltes von «Endometrium» (Siccacell-Präparate Rhein-Chemie)

Von 6 Mäusen, welche am 10. April 1958 ovariektomiert waren, wurden am 9. Juli 1958 in Abständen von zwei Tagen Vaginalabstriche angefertigt, um das Gelingen der Ovariektomie und das Bestehen eines Anoestrus sicherzustellen.

Am 12. Juli 1958 wurde den Tieren eine Suspension von 160 mg/kg Endometrium i. m. injiziert. Anschließend wurden zunächst in zweitägigen, später in dreitägigen Abständen Vaginalabstriche angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. Die Auswertung der Präparate ließ keine Erhöhung der Schollenzahl erkennen. Dies wird besonders deutlich, wenn man den Anstieg der Schollenzahl nach Injektion einer kleinen Menge Progynon (1 Mäuseeinheit = 1 Gamma) zum Vergleich heranzieht (vergleiche folgendes Diagramm = Abbildung 110).

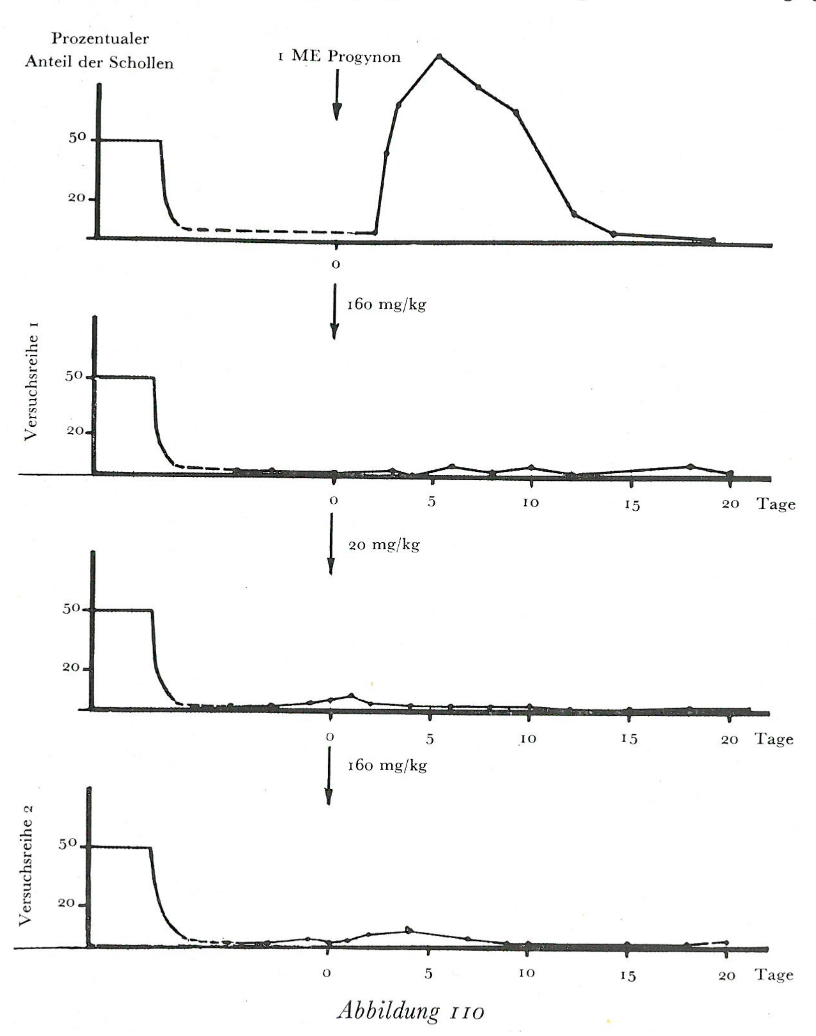


Abbildung 110

Versuchsreihe 2 (siehe Abbildung 110)

Am 21. August 1958 wurden erneut 11 Mäuse ovariektomiert. Die Kontrolle des Operationseffektes durch Abstriche begann am 23. August 1958. Zwei Tiere wurden als nicht absolut sicher im Anoestrus befindlich ausgesondert.

Am 1. September 1958 wurden einer Gruppe von 5 Tieren 20 mg/kg Endometrium (Siccacell Rhein-Chemie) injiziert. Am glei-

chen Tage wurden einer Gruppe von vier Tieren 160 mg/kg Siccacell-Endometrium appliziert. Jeweils am darauffolgenden Tage wurde mit der Kontrolle der Abstriche begonnen.

Bei keiner der beiden Versuchsreihen war eine Erhöhung der Schollenzahl wahrzunehmen. Eine anfängliche minimale Zunahme ist nicht als signifikant anzusehen. Vielleicht mag eine äußerst kleine Menge oestrogener Substanz – nach bisherigen Erfahrungen weniger als 0,1 Gamma – hierfür verantwortlich sein. Bemerkenswert ist noch, daß eine sekundäre Phase oestrogener Wirkung, wie sie zum Beispiel nach Injektion von Siccacell-Ovar nach etwa 12 Tagen deutlich wird, in keiner der drei Versuchsreihen zu beobachten war, obwohl die Abstriche teilweise nach der Injektion 8 Wochen lang fortgesetzt wurden.

In beiden oben beschriebenen Versuchsreihen wurde jeweils von zwei Ampullen das Gewebe gemischt und dann zur Injektion gebracht. Insgesamt wurden also vier Ampullen Siccacell-Endometrium in die Prüfung eingeschlossen.»

Neumann nimmt also an, daß in den Gewebsmengen, die den Mäusen implantiert wurden, – wenn überhaupt etwas – dann weniger als 0,1 Gamma Follikelhormon vorhanden war. Die Mäuse erhielten überwiegend 160 mg/kg von den Zellen als Aufschwemmung injiziert, pro Maus (etwa 20 g) etwa 3 mg. Die Kaninchen mit einem Durchschnittsgewicht von 2500 g erhielten 2 Ampullen injiziert, das sind 90 mg pro Tier (1 Ampulle = 45 mg) = 36 mg/kg.

Mäuse = 160 mg/kg = kein Oestrus
Kaninchen = 36 mg/kg = *Proliferation!*

Obwohl die Kaninchen nur $^1/_4$–$^1/_5$ der Menge an Zellen/kg erhielten, welche den Mäusen zum Allen-Doisy-Test injiziert wurden, zeigten alle 4 Tiere 75 Tage nach Kastration wieder Drüsen, während die Mäuse nach Injektion einer, nach Ansicht von Neumann, großen Menge von Zellen keinen Oestrus zeigten.

Auch Prof. Dr. Hinsberg vom Physiologisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf konnte in den verwendeten Endometrium-Siccacellen nennenswerte und wirksame Mengen von Oestrogen *nicht* feststellen.

Wenn aber nach biologischen und chemisch-analytischen Untersuchungen Oestrogene weder in den Frischzellen-Implantaten noch in den Siccacellen von

Endometrium gefunden wurden, muß man zu der Folgerung kommen, daß die Frisch- und Trockenzellenimplantate einen uterotropen, organspezifischen Effekt im Sinne einer Schleimhautregeneration im Kastratenuterus bewirken.

Zusammenfassung

1. Kastrierten Kaninchen wurden Implantate von Kaninchenendometrium eingepflanzt. Diese Implantate stammten von trächtigen Kaninchen.
2. Es wurden kastrierten Kaninchen Trockenzellen von Endometrium eines trächtigen Kaninchens injiziert.
3. In allen Versuchsreihen ließ sich eine Regeneration der Schleimhaut beim Empfängertier mit deutlicher Drüsenbildung beobachten.
4. Die uterotropen Effekte waren nach Frischzellen- und Trockenzellen-Implantation von gleicher Art und Stärke.
5. Diese Effekte können sehr wahrscheinlich nicht durch hormonale Einflüsse entstanden sein. In Kontroll-Untersuchungen mit dem ALLEN-DOISY-Test und mit chemisch-analytischen Methoden wurden weder in den Frischzellen-Implantaten noch in den Trockenzellen feststellbare Mengen von Oestrogenen nachgewiesen.

Induktion des Organwachstums durch Implantation von homologen Geweben

VON PRIVATDOZENT DR. K. H. NEUMANN, KÖLN

I. Einführung

1916 berichteten MURPHY und Vera DANCHAKOFF in einer kürzeren Publikation über folgende Versuche:

In Hühnereiern wurde 7 Tage nach Beginn der Bebrütung nach Öffnung der Kalkschale unter sterilen Bedingungen ein kleines Stückchen Gewebe von verschiedenen Organen ausgewachsener Hühner auf die Chorion-Allantois-Membran aufgebracht. Danach wurde das Ei verschlossen und weiter bebrütet. Am 17. Tage nach Beginn der Bebrütung wurden die Eier erneut geöffnet und Eihäute und Embryo auf Veränderungen untersucht. Es zeigte sich, daß nach dem Einbringen von Milz, Leber, Knochenmark und Niere mehrere bis grieskorngroße halbdurchsichtige Knötchen auf den Eimembranen entstanden waren, deren Zellelemente Mutterzellen von Leukocyten vergleichbar waren. Vor allem aber konnte bei zahlreichen Embryonen eine Vergrößerung der Milz beobachtet werden. Während nach Einbringen von Milzgewebe die Milz des Embryos oft auf ein Vielfaches ihres normalen Umfanges vergrößert gefunden wurde und in der Zelldifferenzierung weit über das normale Maß hinaus fortgeschritten war, verursachten Gewebestückchen anderer Organe keine oder nur geringe Vergrößerung der Milz. Die Implantation von Muskulatur, Sarkomgewebe, Knochen oder Knorpel beeinflußte die Milz des Embryos in keiner Weise.

Diese Beobachtungen ließen auf einen Wirkungsmechanismus schließen, der auf Gewebe gleichartiger Organe begrenzt ist. Somit bestand ein Interesse, diese Versuche unter dem Gesichtswinkel der Zellulartherapie zu wiederholen und – falls sie sich bestätigen ließen – nach Möglichkeit zu erweitern.

II. Untersuchungsmethodik

In 7 Versuchsreihen wurden 1140 Hühnereier zur Bebrütung gebracht. Nach Aussonderung der unbefruchteten oder in ihrer Ent-

wicklung zurückgebliebenen Eier blieben 506 Eier zur Implantation. In diesen starb ein Teil der Embryonen ab, und ein Teil der Eier ging durch autolytische Prozesse verloren. Insgesamt gelangten 372 Embryonen zur Auswertung.

Bei der Durchführung der Versuche wurde im wesentlichen auf die Methodik von MURPHY und DANCHAKOFF zurückgegriffen. Die Eier wurden am 7. Tag der Bebrütung steril geöffnet. Es wurden kleine Stückchen des zu prüfenden Gewebes auf die äußere Membran des Eies aufgelegt. In einzelnen Fällen wurde diese Membran angestochen und das Gewebe darunter geschoben. Danach wurde das Ei durch ein Stück Leukoplast verschlossen und bis zum 17. Tage weiter bebrütet. Die Eier wurden dann erneut geöffnet, die Kalkschale zerstört und die Embryonen durch Einlegen in Formalin abgetötet und gehärtet.

Am darauffolgenden Tage wurde die Sektion vorgenommen. Allen Embryonen wurde die Milz entnommen und nach äußerlicher Beurteilung auf einer empfindlichen Torsionswaage gewogen. Um die bei der Wägung sehr kleiner Organe leicht zu Fehlern führende Gewichtsabnahme durch Verdunstung von Feuchtigkeit auszuschließen, wurden die Organe gleich nach der Entnahme in vorher genau ausgewogene dünne Aluminiumfolien eingeschlossen. Bei der Mehrzahl der Embryonen wurden ferner Niere und Leber beurteilt und gewogen. Von einem Teil der Organe wurden mikroskopische Präparate angefertigt.

III. Untersuchungsergebnisse

Nach Implantation von etwa stecknadelkopfgroßen, unter sterilen Bedingungen frisch gewonnenen Stückchen von Hühnermilz war bei 7 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen eine allgemeine Vergrößerung der Milz des Embryos von durchschnittlich 10 mg Gewicht auf etwa 12 bis 13 mg Gewicht zu beobachten. Auffällig war, daß sich einige Milzen besonders stark, zuweilen bis auf das Zwei- bis Dreifache des normalen Gewichtes vergrößert hatten. Um dies anschaulich zu machen, wird in den folgenden Tabellen der Prozentsatz der Milzen mit mehr als 16 mg Gewicht gesondert aufgeführt.

Hinsichtlich der Gewichtszunahme der Milz können wir die Ergebnisse von MURPHY und DANCHAKOFF – wie Tabelle 11 zeigt –

bestätigen. Darüber hinaus können wir zeigen, daß auch das Gewicht der Nieren der Embryonen nach Implantation von Milzgewebe eine Zunahme von durchschnittlich 88 auf 104 mg erfährt. Das Lebergewicht bleibt dagegen fast unverändert. Da es sich um Durchschnittswerte von 76 bzw. 90 Embryonen handelt, sind die gefundenen Unterschiede als signifikant zu betrachten.

Tabelle 11

Vergleich des Gewichtes von Milz, Leber und Niere von 17 Tage alten Hühnerembryonen nach Einbringen von Milzgewebe auf die Chorion-Allantoismembran. (Bei der Errechnung der Mittelwerte ist die unterschiedliche Embryonenzahl in den Versuchsgruppen berücksichtigt worden.)

Transplantat	Embryonen	Milz			Niere	Leber
		Gew. mg	über 16 mg Anteil	über 16 mg Gew.	mg	mg
Kontrolle (ohne Transplantat)	8	11,2	—	—	—	—
« « «	7	10,6	—	—	76	342
« « «	8	10,3	—	—	—	331
« « «	14	10,3	1	16	94	313
« « «	19	9,8	—	—	98	369
« « «	10	10,2	—	—	89	337
« « «	10	10,7	—	—	68	342
Mittelwert	76	10,4	1,3 %	16	88	342
*Milz*stückchen ca. 1 mg	8	14,0	4	18,6	—	—
« « 1 «	8	13,3	2	17,5	—	—
« « 1 «	8	13,4	2	18,8	—	—
« « 1 «	18	13,5	3	18,0	—	391
« « 1 «	11	13,7	2	28,0	99	309
« « 1 «	18	16,3	4	22,7	105	342
« « 1 «	19	14,2	3	18,5	107	364
Mittelwert	90	14,3	22 %	20	104	356

Um auch die histologischen Angaben von MURPHY und DANCHAKOFF zu überprüfen, wurden mikroskopische Präparate der Milzen von Embryonen nach Implantation sowie von unbehandelten Kontrollembryonen angefertigt. Die Untersuchungen zeigten, daß die Gewichtserhöhungen in erster Linie unter dem Einfluß einer Entwicklungsbeschleunigung der Milz zustande kommt. Während das Milzorgan der unbehandelten Embryonen noch undifferenziert war oder gerade die ersten Ansätze zu einer Differenzierung zeigte, war nach Implantation von Milzgewebe ein beträcht-

licher Fortschritt in der Gewebedifferenzierung zu beobachten. In vielen Fällen konnte bereits eine deutliche Abgrenzung der roten und weißen Pulpa sowie die Ausbildung von Trabekeln und Keimzentren beobachtet werden.

Vor Durchführung weiterer Arbeiten wurden zunächst einige Kontrollversuche durchgeführt, um gegen unspezifische Reaktionen gesichert zu sein. Wie die Tabelle 12 zeigt, wurden zu Kontrollzwecken 10 Hühnereier geöffnet, die Chorion-Allantois-Membran angeritzt und das Ei ohne Aufbringen von Gewebe wieder verschlossen. Es wurde ferner an Stelle des Gewebes ein Milchtropfen und in einer weiteren Versuchsreihe ein etwa gleich großes Gelatinestückchen aufgebracht.

Während die ersten beiden Versuchsbedingungen das Gewicht und Aussehen der embryonalen Milz, Niere und Leber über die Streuung der Versuchsergebnisse hinaus nicht beeinflussen, zeigt sich nach Einbringen von Gelatine ein Hemmungseffekt auf Milz und Niere. Aus diesen Kontrollversuchen geht jedenfalls hervor, daß ein unspezifischer Reizeffekt allein für das Zustandekommen der Vergrößerung und Entwicklungsbeschleunigung der Organe nicht ausreicht.

Tabelle 12

Kontrollversuche. Unverändertes Milzgewicht nach Einbringen von Milch oder bloßem Anritzen der Chorion-Allantoismembran. Entwicklungshemmung nach Einbringen von Gelatine.

Transplantat	Embryonen	Milz Gew. mg	Milz über 16 mg Anteil	Milz über 16 mg Gew.	Niere mg	Leber mg
Kontrollen	56	10,2	2%	17	87	352
angeritzt - verschlossen	10	10,6	—	—	77	341
kleine Milchtropfen	21	10,4	5%	18	72	348
Gelatinestückchen 5%	26	8,3	—	—	63	338

Nach diesem befriedigenden Ausfall der Kontrollreaktionen wandten wir uns der Frage zu, wie weit die Wirkung der Implantation eines bestimmten Organes auf das homologe Erfolgsorgan begrenzt ist. Zu diesem Zweck wurde wiederum in eine größere Anzahl von Eiern in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Ver-

suchsreihen je ein Stückchen Milzgewebe, Leber- und Nierengewebe eingebracht. Die Milzen, Nieren und Lebern der Embryonen wurden gewogen. Die Resultate zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13

Einfluß der Einbringung von Milz-, Leber- und Nierengewebe auf das Gewicht dieser drei Organe.

Transplantat	Embryonen	Milz			Niere	Leber
		Gew. mg	über 16 mg		mg	mg
			Anteil	Gew.		
Kontrollen	76	10,4	1 %	16	87	347
Milzgewebe	90	14,2	22 %	22	104	365
Lebergewebe	19	10,9	2 %	21	86	351
Nierengewebe	69	12,4	17 %	19	129	352

Aus diesen Versuchen geht, wie auch Tabelle 14 noch einmal anschaulich demonstriert, folgendes hervor:

Die Einbringung von *Milzgewebe* in das Hühnerei führt in erster Linie zu einer Entwicklungsbeschleunigung und Vergrößerung der Milz. Schwächer, jedoch noch immer signifikant, ist die Zunahme des Nierengewichtes. Das Gewicht der Leber bleibt durch die Implantation von Milzgewebe praktisch unbeeinflußt.

Die Einbringung von *Nierengewebe* in das Hühnerei führt in erster Linie zu einer Vergrößerung der Niere, die im Durchschnitt das Eineinhalbfache des Gewichtes bei den Kontrolltieren erreicht. Das Gewicht der Milz wird durch Implantation von Nierengewebe eindeutig beeinflußt, jedoch ist der Effekt schwächer als nach Einbringen der gleichen Menge Milzgewebe. Die Leber bleibt durch die Implantation von Nierengewebe unbeeinflußt.

Die Einbringung von *Lebergewebe* ist sowohl auf Milz und Niere des Embryos als auch auf die Leber selbst wirkungslos. Die Leber ist somit als Erfolgsorgan wie als Spenderorgan inaktiv.

Es ist nicht ohne Interesse, diese Beobachtungen zu der bei anderen Versuchen oder in der Klinik beobachteten Wirkung von Siccacellpräparaten in Parallele zu setzen.

Zuvor soll jedoch noch über einige weitere Versuche berichtet werden, die über den Einfluß der eingebrachten Gewebemenge und der Behandlung des Gewebes unternommen wurden:

Tabelle 14

Prozentuale Gewichtszunahme von Milz, Leber und Niere nach Implantation von Milz-, Leber- und Nierengewebe.

Transplantat	*Erfolgsorgan* Gewichtszunahmen gegenüber Kontrolltieren		
	Milz	Niere	Leber
Milz	36%	20%	2%
Niere	19%	48%	1%
Leber	4%	1%	1%

Wie eingangs beschrieben wurde, führt die Implantation von Gelatinestückchen zu einem negativen Effekt, indem sowohl das Milzgewicht als auch das Nierengewicht gegenüber Kontrolltieren verringert ist. Es wurde untersucht, ob der Zusatz kleiner Gewebemengen zur Gelatine imstande ist, diese negative Wirkung der Gelatine aufzuheben.

Es zeigte sich, daß hierzu Mengen unter 0,02 mg Gewebe nicht ausreichen. Die gleiche Menge Gewebe, zusammen mit Gelatine aufgebracht, ist nach sehr feiner Zerkleinerung wirksamer als in etwas größeren Partikeln (Tabelle 15).

Tabelle 15

Abhängigkeit der Organvergrößerung von der in das Ei eingebrachten Gewebemenge.

Transplantat	Embryonen	Milz			Niere	Leber
		Gew.	über 16 mg			
		mg	Anteil	Gew.	mg	mg
Gelatine-Stückchen	26	8,3	—	—	63	338
Gelatine mit 0,1 % Gewebe (ca. 0,002 mg)	21	8,9	—	—	63	295
Gelatine mit 2,0 % Gewebe (ca. 0,02 mg)						
a) kleinste Stückchen	34	10,5	6%	17	96	373
b) größere Stückchen	19	9,9	9%	22	—	372
Milz 1 Gewebestückchen	90	14,0	22%	22	104	365
3 Gewebestückchen	21	14,2	28%	19	105	357
6 Gewebestückchen	15	18,5	33%	33	97	345

Für eine Dosis-Abhängigkeit des von Murphy und Danchakoff beobachteten Phänomens spricht auch die Beobachtung, daß die gleichzeitige Einbringung einer größeren Anzahl von Gewebestücken in das Hühnerei wenigstens bei der Milz eine deutliche Verstärkung der Gewichtszunahme und eine zusätzliche Entwicklungsbeschleunigung herbeiführt. Durch Implantation von 6 Milzstückchen von etwa 1 mg Gewicht konnte das Durchschnittsgewicht der Milz gegenüber den Kontrollwerten fast verdoppelt werden.

In einzelnen Fällen wurde das Gewicht der Milz gegenüber der Norm mehr als vervierfacht gefunden.

Als letztes wurde untersucht, welche in der Zellulartherapie häufig vorkommenden Maßnahmen die Fähigkeit des Gewebes, bei der geschilderten Versuchsanordnung eine Vergrößerung des homologen Erfolgsorganes herbeizuführen, zerstören. Die Tabelle 16 zeigt eine Zusammenstellung der durchgeführten Versuche. Einfaches Einfrieren und Wiederauftauen vermag die Fähigkeit des zu implantierenden Gewebes, eine Vergrößerung des homologen Organes herbeizuführen, nicht signifikant zu beeinflussen. Auch nach Gefriertrocknung bleibt die Fähigkeit des Milzgewebes, eine Vergrößerung der embryonalen Milz zu verursachen, nachweisbar. Dagegen ist nach einstündiger Einwirkung einer Temperatur von 60° C auf das frische Gewebe die Aktivität des Transplantates erloschen. Ein wäßriger Extrakt von Milzgewebe bleibt unwirksam. Bemerkenswerterweise ist auch ein Homogenat aus Milzgewebe, welches durch 15minütige,

Tabelle 16

Einfluß verschiedener Maßnahmen auf die Aktivität implantierten Milzgewebes.

Transplantat	Embryonen	Milz			Niere	Leber
		Gew. mg	über 16 mg Anteil	über 16 mg Gew.	mg	mg
Kontrollen	56	10,2	2%	17	89	337
*Milz*stückchen frisch	90	14,0	22%	22	104	365
*Milz*stückchen eingefroren – aufgetaut	7	12,8	14%	19	—	—
Gefriertrocknung (Siccacell)	38	13,6	9%	18,2	96	372
Wärmeeinwirkung (1 h 60° C)	29	10,2	—	—	92	357
Gewebeextrakt, wäßrig	15	9,8	—	—	68	359
Milz – Homogenat	15	10,5	13%	18	76	327

rasche Rotation scharfer Stahlmesser hergestellt wurde und bei welchem durch mikroskopische Kontrolle keine unzerstörten Zellen mehr nachgewiesen werden konnten, weitgehend unwirksam geworden.

Prinzipiell die gleichen Resultate lassen sich bei entsprechender Behandlung von Nierengewebe beobachten. Auch hier ist ein wäßriger Extrakt des Organs wirkungslos.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Einbringung kleiner Gewebestückchen auf bestimmte Organe des Embryos gerichtete Wirkungen im Sinne einer Wachstums- und Differenzierungsbeschleunigung des Erfolgsorganes herbeiführen kann. Im Hinblick auf die Zellulartherapie ist das Bestechende bei dieser Versuchsanordnung, daß die Wirkung auf das Erfolgsorgan durch Wägung relativ einfach und vor allem eindeutig erfaßt werden kann. Gegenüber zahlreichen anderen Versuchen, im naturwissenschaftlichen Experiment Aussagen über die Auswirkungen der Zellulartherapie zu machen, liegt hierin ein großer Vorteil.

Andererseits ist natürlich die Frage zu stellen, wie weit die hier benutzte Versuchsanordnung auf die Zellulartherapie übertragen werden kann. Wir haben das Gewebestückchen nicht per injectionem «implantiert», sondern nur mit den Eihäuten in Kontakt gebracht. In Anbetracht der Gefäßversorgung der Eihäute scheint uns hierin kein prinzipieller Unterschied zu liegen. Wir werden hierin durch Experimente von ANDRES bestätigt, der nach Injektion von Gewebe in die Blutbahn von Embryonen eine ähnliche Beschleunigung der Organdifferenzierung beobachten konnte (vgl. S. 245 ff.).

Ein anderer Unterschied liegt darin, daß wir die Entwicklungsbeschleunigung embryonaler Organe erfassen, während die Aufgabe der Zellulartherapie im allgemeinen in der Regeneration erkrankter Organe gesehen wird. Ebensowenig paßt die Zeitspanne zwischen Applikation des Gewebes und Eintritt der Wirkung in das von der Zellulartherapie gewohnte Schema. Es muß demnach bei kritischer Betrachtung als unentschieden angesehen werden, ob eine unmittelbare Übertragung der Ergebnisse mit der Versuchsanordnung von MURPHY und Vera DANCHAKOFF auf die Zellulartherapie möglich ist.

Wenn wir unter Beachtung dieses Vorbehaltes den Versuch unternehmen, die Resultate unserer Experimente unter den Gesichtswinkel der Zellulartherapie zu stellen, so sehen wir folgendes: Eine Beschleunigung der Entwicklung von Niere und Milz ist nur durch Einbringen von Organgewebe möglich. Ein rein mechanischer Reiz oder das Einbringen von Milch oder Gelatine sind unwirksam.

Die Wirkung des eingebrachten Gewebes ist in unterschiedlichem Maße organspezifisch. Während Lebergewebe weder als Implantat noch als Erfolgsorgan anspricht, haben Milz und Niere als Implantat eine zwar vorzugsweise auf das homologe Organ gerichtete Wirkung. Doch beeinflußt die Einbringung von Nierengewebe bis zu einem gewissen Grade auch die Milz und umgekehrt. Es müßte sehr interessant sein, die Untersuchung dieser Beziehungen auf eine größere Zahl von Organen ausdehnen zu können.

Eine Reihe von Parallelen besteht auch hinsichtlich der Empfindlichkeit der wirksamen Faktoren des Gewebes gegen äußere Maßnahmen. Wie bei der Zellulartherapie bleiben die wirksamen Komponenten des Gewebes nach Einfrieren und nach Gefriertrocknung erhalten. Durch stärkeres Erhitzen werden sie zerstört. Wäßrige Extrakte der Gewebe sind unwirksam. Ebenso erscheint es bemerkenswert, daß durch Homogenisieren des Gewebes, das heißt durch Zertrümmern der Zellen, die Wirkung des eingebrachten Gewebematerials sehr stark herabgesetzt wird.

So vorsichtig man beim gegenwärtigen Umfang der Arbeiten auch mit einem abschließenden Urteil sein sollte, so versprechen diese Versuche doch eine interessante Ergänzung der Versuchsmethoden zu einer reproduzierbaren Testung der Wirkung implantierten Gewebes.

Wirkungsspezifität implantierter endokriner Gewebe

VON DR. MED. J. STEIN, HEIDELBERG

Die Überpflanzung von Geweben zu therapeutischen Zwecken und die Endokrinologie haben eine gemeinsame Entwicklung. Durch Überpflanzung von Drüsen wurde man auf deren innersekretorische Funktion hingewiesen. HUNTER (1771) in England und BERTHOLD (1849) in Göttingen haben experimentell die substituierende Wirkung implantierter Hoden beim kastrierten Hahn festgestellt. Claude BERNARD prägte 1857 den Begriff der «inneren Sekretion». Im Selbstversuch stellte BROWN-SÉQUARD 1889 nach subcutaner Injektion eines wäßrigen Hunde-Hoden-Extraktes eine verjüngende Wirkung fest. Der vorübergehende Effekt beruhte auf der Wirkung von Hormonen, die er unbewußt angewendet hatte.

Aus dem Bestreben, bei endokrinen Insuffizienzen eine therapeutische Wirkung von längerer Dauer zu erreichen, entwickelte sich seit der Jahrhundertwende die Methode der chirurgischen Überpflanzung innersekretorischer Drüsen. Bis dahin hatten die Chirurgen vorwiegend Knochen- oder Haut-Transplantationen ausgeführt. Etwa seit der Jahrhundertwende begann man Keimdrüsen zu überpflanzen, hauptsächlich in der Absicht, eine Verjüngung zu bewirken. Keimdrüsen wurden zunächst von Tier zu Tier übertragen.

Eine erschöpfende Darstellung der Entwicklung der chirurgischen Überpflanzung innersekretorischer Drüsen würde die Grenzen dieses Buches überschreiten. Einige Pioniere auf diesem Gebiete seien aber doch erwähnt: HARMS, STEINACH, PÉZARD, VORONOFF, ROMEIS, COURIER und ARON. Diese Forscher experimentierten mit verschiedenen Tierarten und beobachteten übereinstimmend eine auffallende und lang anhaltende Revitalisation alter Tiere.

Als im Tierversuch die Grundlagen erarbeitet waren, gingen die Chirurgen dazu über, Keimdrüsen nunmehr auch vom Tier auf den Menschen zu überpflanzen. Pioniere auf diesem Gebiete waren: BONDET (Paris), COCHEZ (Algier), DARTIGNES (Paris), DUPNY DE

Frenelle (Paris), Durante (Rom), Frugoni (Florenz), Lattisbey (Alexandrien), Le Gattelier (Paris), Marro (Turin), Parade (Neustadt), Pettinari (Mailand), Prat (Nizza), Sabit (Konstantinopel), Schleier (Wien), Schönbauer (Wien), Spiur (Buenos Aires), Steinach (Wien), Thorek (Chicago), Tuffier (Paris), Valverde (Rio de Janeiro), Voronoff (Paris).

Die überpflanzten Keimdrüsen stammten zumeist von Haustieren, zum Teil auch von Menschenaffen.

Man erkannte bald, daß die Artverwandtschaft zwischen Spender und Empfänger das Resultat einer Transplantation günstig beeinflußte und überpflanzte deshalb auch Drüsen von Mensch zu Mensch. Morris transplantierte 1906 menschliche Eierstöcke auf eine kastrierte Frau. Vier Monate später traten erneut menstruelle Blutungen auf. Herrmann und Sutten übertrugen 1912 die Testes einer Leiche auf einen kastrierten Mann. 1925 entnahm Comolli bei einer Kropfoperation einer jungen Frau eine Nebenschilddrüse, um sie einem Kranken einzupflanzen, der an Tetanie litt. 1931 hat Dolby Zuckerkranken die Bauchspeicheldrüsen von neugeborenen, nicht lebensfähigen Kindern eingesetzt.

Die Weiterentwicklung der Überpflanzung homologer und heterologer endokriner Drüsen verlor etwa ab 1930 an Interesse. Das lag weniger an der Umständlichkeit, den möglichen Komplikationen und dem unsicheren Erfolg chirurgischer Überpflanzungen von Drüsen, sondern mehr an der stürmischen Entwicklung der Hormontherapie.

Der Begriff des Hormons (ὁρμαω = ich rege an) wurde 1905 durch Bayliss und Starling geprägt. Sie kennzeichneten damit das in der Darmschleimhaut gebildete Sekretin, das die Sekretion der Bauchspeicheldrüse anregt.

Die Anwendung der aus endokrinen Drüsen isolierten Hormone und ihrer synthetischen Analoge verdrängten in der Endokrinologie vorübergehend die Transplantation. Neuerdings, nachdem auch die Grenzen und Gefahren der substituierenden Hormontherapie bekannt sind, wendet sich die Forschung wieder der Transplantation zu. Man hat gelernt, daß ein Transplantat doch anders wirkt als ein Hormon. Der Effekt des Hormons ist zeitlich aufs engste gebunden an seine Anwesenheit im Organismus. Überdosierung oder Dauer-

anwendung von Hormonen kann eine Inaktivitätsatrophie korrespondierender Drüsen bewirken.

Es gab einige Forscher, die an dem chirurgischen Verfahren der Überpflanzung ganzer Drüsen oder von Drüsenstücken festhielten. Einer der überzeugtesten Anhänger des therapeutischen Wertes der Transplantation war NIEHANS. Er hatte ab 1927 Hypophysenvorderlappen von Kälbern auf menschliche hypophysäre Zwerge übertragen und damit teilweise ein Längenwachstum bis zu 32 cm erreicht. Ab 1928 überpflanzte er Hypophysenvorderlappen von Schafen auf Frauen mit primärer Amenorrhoe und sah auch hier gute und teilweise bleibende Resultate. Ab 1929 übertrug er Hypophysenhinterlappen nebst Hypophysenstiel bei Diabetes insipidus und sah eine therapeutische Wirkung auf die Diurese und den Durst. Ab 1929 transplantierte er mit gutem Erfolg Nebennieren bei Polyarthritis. 1931 wurde ihm eine Frau mit schwerer postoperativer Tetanie überwiesen. Da die Patientin stark krampfte und in extremis lag, konnte er eine ordnungsgemäße chirurgische Überpflanzung nicht mehr vornehmen. Er zerschnitt deshalb die bereits beschafften Epithelkörperchen vom Rind in kleinste Teile, schwemmte sie mit physiologischer Kochsalzlösung auf und instillierte sie durch ein Troicart in den Musculus pectoralis. Er nahm an, daß die Wirkung – wie nach einer Hormoninjektion – nur von kurzer Dauer sein werde, so daß er später die operative Überpflanzung würde nachholen müssen. Zu seiner Überraschung wurde aber diese Frischzelleninstillation nicht nur reaktionslos vertragen, sondern war auch von anhaltendem Effekt. Auf Grund dieser Erfahrung ging NIEHANS in der Folgezeit ganz zur Technik der Injektionsimplantation über. Aber er blieb zunächst bei der Beschränkung auf endokrine Gewebe. Erst später erweiterte er die Methode auf die Verwendung von nicht endokrinen Geweben, vorzugsweise fetaler Provenienz.

Auch in der späteren Entwicklung der dann als «Zellulartherapie» bekannt gewordenen Implantationsmethode hatten die inkretorischen Gewebe immer noch den Vorrang. Die ersten Versuche zur Objektivierung der Wirkungsspezifität überpflanzter Zellen wurden daher auch mit endokrinen Zellen gemacht.

Die therapeutischen Ergebnisse nach Injektion heterologer innersekretorischer Gewebe führten zu der Erkenntnis, daß eine Hormonwirkung, wenn überhaupt, dann nur kurz auftrat. Die eigent-

liche Wirkung der Zellimplantation stellte sich erst nach Wochen ein und hielt lange Zeit an. Demnach mußten andere Faktoren als die Hormone zur Wirkung kommen.

Eine weitere Erfahrung betraf den organspezifischen Effekt. Die Insuffizienz einer endokrinen Drüse ließ sich meist nur durch Implantation von Gewebe der gleichen Drüse beeinflussen; eine postoperative Tetanie sprach nur auf Epithelkörperchen an, eine Nebenniereninsuffizienz nur auf adrenales Implantat.

Um die Frage nach der Organspezifität zu klären, wurden typische Funktionen oder davon abhängige humorale Veränderungen in ihrer Beeinflußbarkeit durch korrespondierende Zellimplantate analysiert. Es lag nahe, die Unterfunktion der Schilddrüse als Prüfobjekt zu nehmen, weil sich ihr Funktionszustand durch Grundumsatzbestimmung indirekt messen läßt. Der Grundumsatz vor und nach Zellinjektionen erwies sich aber als ungeeignet für die Beurteilung. Es gelang nicht, bei Hypothyreosen eine eindeutige Stimulierung der Schilddrüsenfunktion durch Thyreoidea-Implantate nachzuweisen. Das war aber noch kein Beweis für die Unwirksamkeit oder für die Unspezifität der Zellulartherapie, denn es ergaben sich auch in anderer Hinsicht atypische Befunde nach Schilddrüsenapplikation. KUHN und KNÜCHEL wiesen zum Beispiel nach, daß eine Antikörperbildung nach Injektion von Schilddrüsengewebe nicht einsetzte, während sie nach allen anderen überprüften Organen feststellbar war.

Ein einfacher Vorversuch wurde von KUHN und FUCHS 1954 gemacht. Sie prüften die Wirkung von gefriergetrockneten Zellpräparaten auf die Entwicklung der Larven von Bufo vulgaris.

Eine Implantation von Zellpräparaten war bei diesem Experiment natürlich nicht möglich. Es wurde daher eine Suspension von Schilddrüsen-Trockenzellen in Ringerlösung nach vierstündigem Stehen filtriert und das Filtrat den Gläsern mit Kaulquappen zugesetzt. Das Zellfiltrat wirkte 24 Stunden auf die Tiere ein, dann wurde das Wasser gewechselt. Bereits nach 4 Tagen zeigte sich die typische Schilddrüsenwirkung auf die Metamorphose. Wenn der Versuch auch keine Hinweise für eine Wirkungsspezifität implantierter Schilddrüsenzellen ergab, so zeigte er doch, daß wirksame Thyreoidea-Hormone vorhanden waren.

Um die organspezifische Regeneration durch Zellimplantate nachzuweisen, muß zuvor das Organ des Versuchstieres geschädigt

werden. Die Schilddrüse schien sich hierfür zu eignen, weil sie leicht beeinflußbar und histologisch gut zu beurteilen ist. Goos (1955) führte Versuche mit Thioharnstoff-Gaben und anschließender Injektion von Schilddrüsenzellen durch. Der Thioharnstoff hat eine thyreostatische Wirkung, die sich als Hemmung der Thyroxinsynthese bemerkbar macht und dadurch eine vermehrte Ausschüttung thyreotropen Hormones bedingt. Das histologische Bild der normalen Schilddrüse verändert sich in der Folge im Sinne einer Basedow-Struma, obwohl die Thioharnstoffderivate funktionell entgegengesetzt wirken. Kaninchen erhielten 30 Tage lang täglich 0,1 g Methyl-Thiouracil (MTU). Das führte zu einer histologisch erfaßbaren Schädigung der Schilddrüsenfollikel. Die durch MTU geschädigten Tiere erhielten dann eine intramuskuläre Injektion von Schilddrüsenzellen. Um eine unspezifische Wirkung auszuschließen, bekam ein Teil der Versuchstiere Injektionen von fetaler Muskulatur. Die histologische Auswertung geschah nach folgenden Kriterien: 1. Beschaffenheit des Follikel-Epithels nach Größe der Follikel und Aufbau des Parenchyms, 2. Anzahl der Follikel in einer bestimmten Flächeneinheit, 3. Flächengröße der Follikelanschnitte pro Flächeneinheit. Die erhobenen Befunde wurden in Diagramme eingetragen, die mit den Diagrammen der Normaltiere und der Kontrolltiere verglichen wurden. Goos glaubte, aus seinen Versuchen schließen zu können, daß bei der geschädigten Schilddrüse des Kaninchens die intramuskuläre Implantation von Frisch- wie auch von Trockenzellen der Thyreoidea den Regenerationsprozeß beschleunigte. Er sah eine schnellere Neubildung normaler Follikel, im Gegensatz zu den geschädigten und nicht behandelten Tieren. Die Organspezifität der injizierten Schilddrüsenzellen wurde aus der Beobachtung geschlossen, daß nach Injektion von fetalen Muskelzellen keine signifikanten Unterschiede bestanden zu den MTU-geschädigten Tieren, die keine Zellinjektionen erhalten hatten.

Die Rückschlüsse, die Goos aus seinen Experimenten zog, wurden von Sturm (1955) in Frage gestellt. Er wies darauf hin, daß Thyreostatika wie MTU keine hypothyreote Schilddrüse verursachen. Die Thyreostatika bremsen lediglich die Hormonbildung und Hormonausschüttung. MTU schädigt also nicht die Schilddrüse, sondern hemmt nur die funktionelle Leistung.

Da aber die Sekretion des thyreotropen Hormons der Hypophyse durch MTU nicht gebremst, sondern infolge Thyroxinmangels sogar angeregt wird, werden die Schilddrüsenfollikel aktiviert. Die von Goos beobachteten morphologischen Veränderungen seien also nur als gesteigerte Thyreotropinwirkung aufzufassen. Es sei bekannt, daß eine gleichzeitige Gabe von Thyroxin und MTU die Sekretion des thyreotropen Hormones herabsetzte, so daß die Schilddrüsenfollikel dann unverändert blieben. Die von Goos beobachtete Wirkung der Schilddrüsenzellen sei also nicht der Ausdruck eines gesteigerten Regenerationsprozesses, sondern ein hormonaler Thyroxin-Effekt der implantierten Schilddrüsenzellen.

In eigenen Versuchen hat STURM (1955) festgestellt, daß Trokkenzellen der Schilddrüse eine hormonale Wirkung auf die Meerschweinchenschilddrüse hatten, die er – wie bei Gaben von Schilddrüsentrockensubstanz – als Wirkung von Trijodthyronin und Thyroxin deutete. Zur Klärung der Wirkung von organgleichen Zellimplantaten auf die Schilddrüse führte STURM weitere Tierversuche durch. Er beurteilte die spezifische Aktivierung der Schilddrüse mittels des Radio-Jod-Testes. Um die Schilddrüse zu schädigen, gab er hohe Dosen von Radiojod. Nach 100 Mikro C J^{131} kam es zu einer teilweisen Zerstörung der Schilddrüse, nicht aber zu ihrer Vernichtung. Acht Wochen nach Schädigung der Schilddrüse durch Radiojod wurden die hypothyreoten Tiere mit Trockenzellen der Schilddrüse behandelt («zwei Wochen lang je zwei Ampullen Schilddrüsen-Trockenzellen»). In Auswertung seiner Versuche kam STURM zu dem Schluß, daß Schilddrüsen-Trockenzellen keine spezifisch aktivierende Wirkung auf die Schilddrüsenfunktion hätten. Öfters wiederholte Gaben von Schilddrüsen-Trockenzellen hätten eine Jodwirkung, weil das Jodaufnahmevermögen der Schilddrüse abgesättigt würde. Injektionen von Schilddrüsen-Trockenzellen hätten außerdem eine hormonale Wirkung, die zu einer Ruhigstellung der Schilddrüse der Versuchstiere und Bremsung der Hormonausschüttung ins Blut führe.

Gegen die Versuche von STURM und die daraus gezogenen Schlußfolgerungen wurde eingewandt, daß er zu hoch dosiert habe und die Zellinjektionen zu oft und in zu kurzen Zeitabständen wiederholte.

Kment (1958) führte ebenfalls Tierversuche durch, um einen Einblick zu gewinnen in den möglichen Wirkungsmechanismus von Trockenzellpräparaten der Thyreoidea auf die Meerschweinchen-Schilddrüse. Zur Beurteilung der Schilddrüsenaktivität verwendete er gleichfalls den Radiojodtest. Alle Ergebnisse wurden umfangreichen biostatistischen Berechnungen unterzogen. Kment gelangte zu etwas anderen Ergebnissen als Sturm. Er stellte fest, daß eine Wirkung von Schilddrüsen-Trockenzellen auf die Meerschweinchen-Schilddrüse nicht allein vom Hormongehalt des injizierten Gewebes abhinge, sondern daß dem Zellmaterial selbst ein Effekt zukomme, wenn auch kein spezifischer. Er fand außerdem, daß die Dosierungsfrage und die Dauer der Verabreichung eine große Rolle spielten. Bei Verwendung von weiblichen Versuchstieren sei ferner auf die Wechselbeziehungen mit Gravidität zu achten.

Faßt man die Ergebnisse der Tierversuche zur Klärung einer organ-spezifischen Wirkung von Zellimplantationen auf die *Schilddrüse* zusammen, so ergibt sich keine klare Beurteilung. Anscheinend ist die Schilddrüse ein für solche Untersuchungen ungeeignetes Organ.

Mehr Aufschluß brachten die von Maischein (1955) durchgeführten Versuche an 100 Rattenböcken. Er prüfte die Beeinflussung der Kastrationshypophyse durch Trockenzellpräparate verschiedener Organarten. Geschlechtsreife, kastrierte Rattenböcke erhielten intramuskuläre Zellinjektionen. Als Indikator für die Wirkung der implantierten Zellen diente das histologische Bild der Hypophyse. In die Versuche wurde spezifisches endokrines und unspezifisches Gewebe einbezogen. Die implantierten Gewebe waren gefriergetrocknet oder «frisch». Als Gewebearten wurden geprüft: Ovar, Testis, fetale Muskulatur und fetaler Herzmuskel. Der zeitliche Abstand der Zellimplantationen von der Kastration betrug bei einer Gruppe 28 Tage und bei einer anderen 186 Tage.

Die endokrin neutralen Implantate von Skelettmuskel und Herz verhinderten die Entwicklung einer Kastrationshypophyse nicht. Auch durch gegengeschlechtliche Gonaden (Ovar) konnte bei den kastrierten Rattenböcken die Kastrationshypophyse nicht unterdrückt werden. Nach Implantation von Testiszellen zeigten sich hingegen im histologischen Schnitt keine Veränderungen im Sinne der Kastrationshypophyse. Die Injektion von Testiszellen wirkte

sogar regressiv auf das frühe Stadium der Kastrationshypophyse. Ein Wirkungsunterschied zwischen unmittelbar übertragenen Frischzellen und gefriergetrockneten Zellen bestand nicht.

Die klareren Resultate der Versuche mit der Kastrationshypophyse beruhen wahrscheinlich auf der besseren Reaktionsfähigkeit dieses Organs. Die Hemmung der Kastrationshypophyse durch Testis-Implantate und die Regression sprechen für eine organspezifische Wirkung. Ein Effekt der in den Testiszellen enthaltenen Hormone kann ausgeschlossen werden, weil die Menge zu gering war. Der Wirkungsmechanismus der implantierten Testiszellen ist unklar. Eine Regeneration des korrespondierenden Organes war nicht möglich, weil die Hoden fehlten. Die Wirkung konnte in diesem Falle ebenso wenig über das «Erfolgsorgan» gehen, wie bei den Versuchen von NEUMANN und KMENT, die bei kastrierten weiblichen Mäusen durch Implantation von Ovarzellen wiederholte Oestrusphasen über längere Zeit erzeugten.

Die Wirkungsspezifität endokriner Zellimplantate ist im Tierversuch so schwer zu klären, weil es nicht gelingt, beim Tier Krankheiten oder endokrine Unterfunktionen zu erzeugen, die denen des Menschen entsprechen. Selbst wenn es möglich wäre, durch definierte Noxen einigermaßen vergleichbare Zustände zu schaffen, kann die Reaktion des Laboratoriumstieres auf das Implantat eine andere sein als die des Menschen. Beim Tierexperiment kann man gültige Aussagen nur erwarten, wenn die Tierphysiologie und die individuellen Eigenschaften jeder Tierart im Ansatz und in der Auswertung eines Versuches berücksichtigt sind, und wenn die Experimente an einer genügend großen Zahl von Tieren erfolgen und biostatistisch ausgewertet werden.

Außer im Tierversuch wurde die Prüfung zellular-therapeutischer Wirkungen beim Menschen selbst unternommen. Bei der Wahl der Versuchsanordnung war zu berücksichtigen, daß die Zellulartherapie nicht analog den chemotherapeutischen, substituierenden Therapiearten eine unmittelbare Wirkung entfaltet, sondern daß der Effekt allmählich eintritt. Bei den für die Zellulartherapie indizierten chronisch degenerativen Erkankungen war es schwierig, den Kausalzusammenhang zwischen einer beobachteten Besserung und den therapeutischen Maßnahmen zu beweisen. Die Frage nach einer Wirkung und besonders nach einer organspezi-

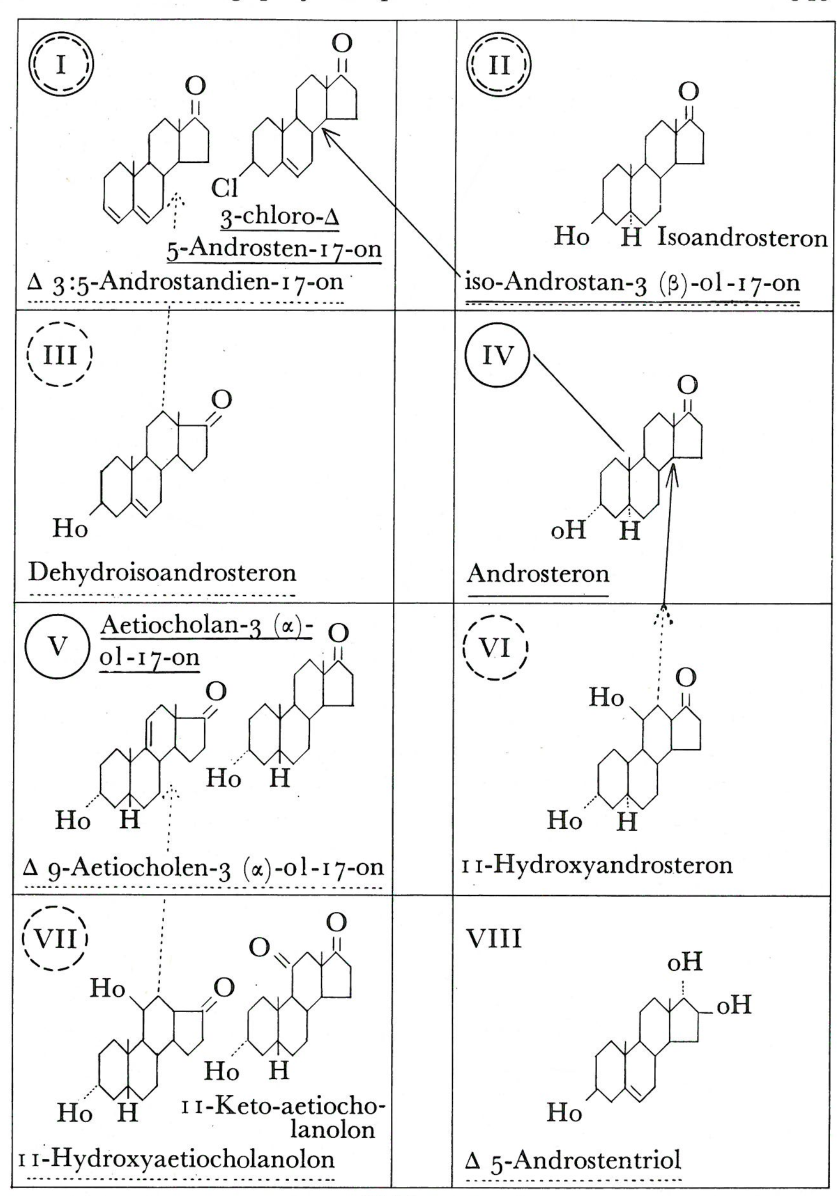


Abbildung 111

Ketosteroid-Fraktionen. Die ausgezogen unterstrichenen (———) Komponenten entstammen – zumindest beim Manne – den Keimdrüsen, während die unterbrochen gestrichelten (··········) Komponenten von der Nebennierenrinde stammen.
(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)

fischen Wirkung implantierter Zellen ließ sich daher nur so klären, daß bestimmte Organfunktionen oder von diesen abhängige humorale Veränderungen analysiert wurden. Dieser Weg wurde von KUHN und KNÜCHEL (1955) beschritten. Zum Nachweis einer organspezifischen Beeinflussung durch korrespondierende Zellimplantate wählten sie diejenigen innersekretorischen Drüsen, deren Hormonproduktion direkt oder indirekt meßbar ist. Diese Möglichkeit ist gegeben bei der Hypophyse, den innersekretorischen Anteilen der Geschlechtsdrüsen und bei der Nebennierenrinde. Der Funktionszustand dieser Drüsen läßt sich aus der Harnsteroid-Ausscheidung beurteilen. Der Anteil der im Harn ausgeschiedenen Hormonderivate erlaubt Rückschlüsse auf die Tätigkeit einzelner innersekretorischer Drüsen. Besonders geeignet für solche Bestimmungen sind die Gesamtcorticoide und die 17-Ketosteroide, deren Fraktionen durch Säulenchromatographie mit Al O_3 getrennt werden können. (CALLOW 1939, DINGEMANSE 1946 und ROBINSON 1953).

KUHN und KNÜCHEL hatten festgestellt, daß die Gesamtausscheidung der 17-Ketosteroide sowohl nach Injektion von Zellen der Hypophyse als auch der Nebenniere und der Testes zunahm. Gerade bei einer gesteigerten Steroidausscheidung blieb aber die Frage offen, ob die parenterale Zufuhr artfremden Eiweißes nicht in unspezifischer Art einen Stress ausgelöst hatte. Dagegen sprach allerdings die über mehrere Wochen anhaltende erhöhte Ausscheidung der Steroide. Um aber die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung auszuschließen, wurde zunächst der Einfluß untersucht, den eine Injektion von nicht endokrinen Geweben auf die Ausscheidung der einzelnen Steroide ausübt.

Die Injektion von Trockenzellsuspensionen aus fetaler Schafslunge ergab keine über die normalen Schwankungen hinausgehende Veränderung der Menge der einzelnen Steroidkomponenten. Auch eine Injektion von Herzzellen beeinflußte die Steroidausscheidung nicht nachweisbar.

Außer diesen endokrin «neutralen» Geweben wurden auch solche Mittel geprüft, wie sie für die *unspezifische Reizkörpertherapie* angewendet werden. Vor und nach einer «Pyrifer»-Injektion zeigten sich entweder keine wesentlichen Unterschiede in den Werten der Harnsteroidfraktionen – oder aber es traten unspezifische, uncharakteristische Steigerungen auf, die unmittelbar einsetzten und rasch

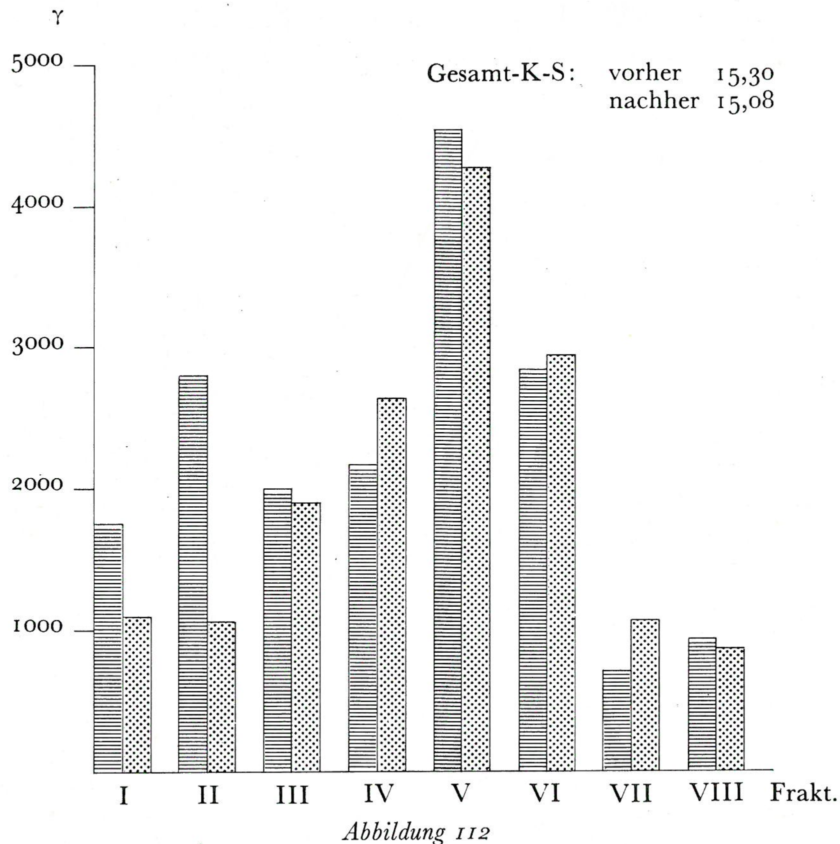


Abbildung 112

17-Ketosteroidausscheidung vor *und 11 Tage* nach *Injektion von Trockenzellen der* Lunge. *Mittelwerte aus 4 Bestimmungen.*

▤ *vor* ▨ *nach*

(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)

wieder abklangen. Im Gegensatz dazu erreichte die Wirkung der Injektion innersekretorischer Drüsenzellen erst nach etwa 8 bis 14 Tagen ihr Maximum und klang nach vielen Wochen allmählich wieder ab.

Nachdem ein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Wirkung unspezifischer Reizmaßnahmen und dem Effekt der Implantation endokrin aktiver Gewebe feststand, wurden die einzelnen innersekretorischen Drüsen durchgeprüft.

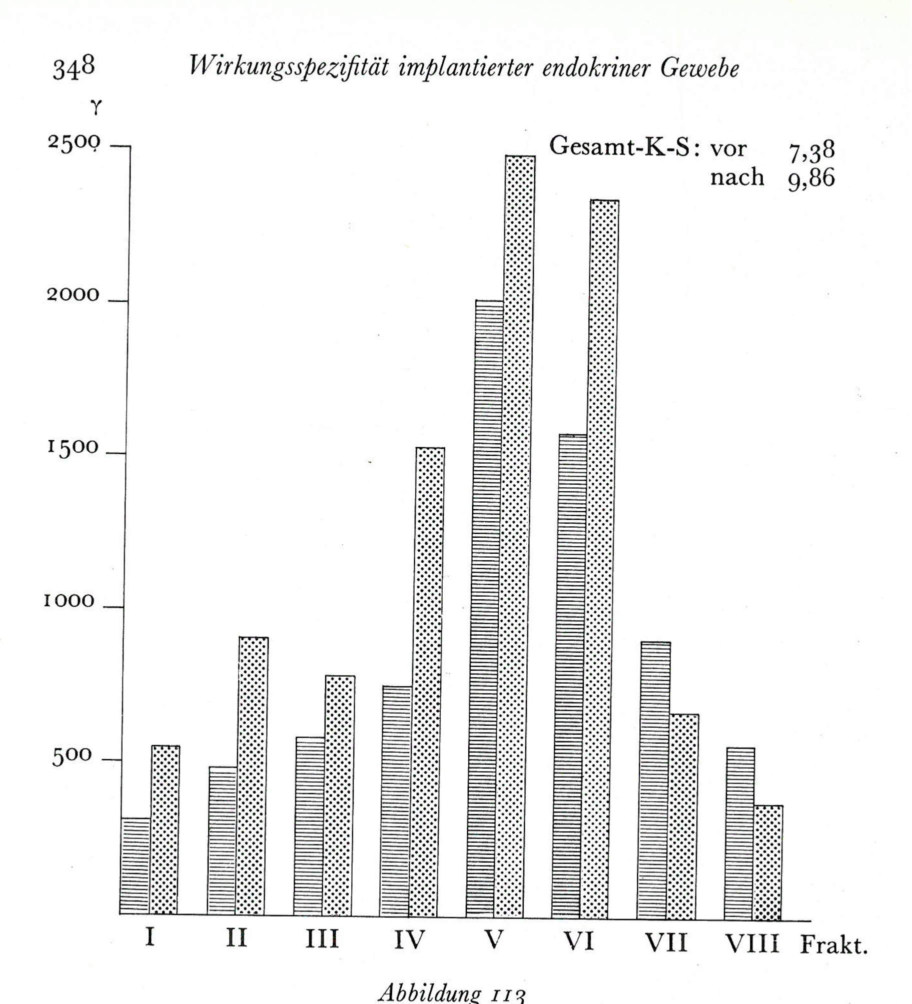


Abbildung 113

17-Ketosteroidausscheidung vor *und 18 Tage* nach *Injektion von Trockenzellen der* Hypophyse. *Mittelwerte aus 10 Bestimmungen.*

▤ *vor* ▩ *nach*

(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)

Nach *Hypophysen-Implantation* fand sich ein allgemein stimulierender Einfluß, der sich in einer erhöhten Produktion aller 17-Ketosteroidfraktionen ausdrückte. Dieser Effekt ließ sich durch eine organspezifische Stimulierung der Hypophyse erklären, deren trope Hormone vermehrt ausgeschüttet wurden und ihrerseits die Tätigkeit der Keimdrüsen und der Nebennieren anregten.

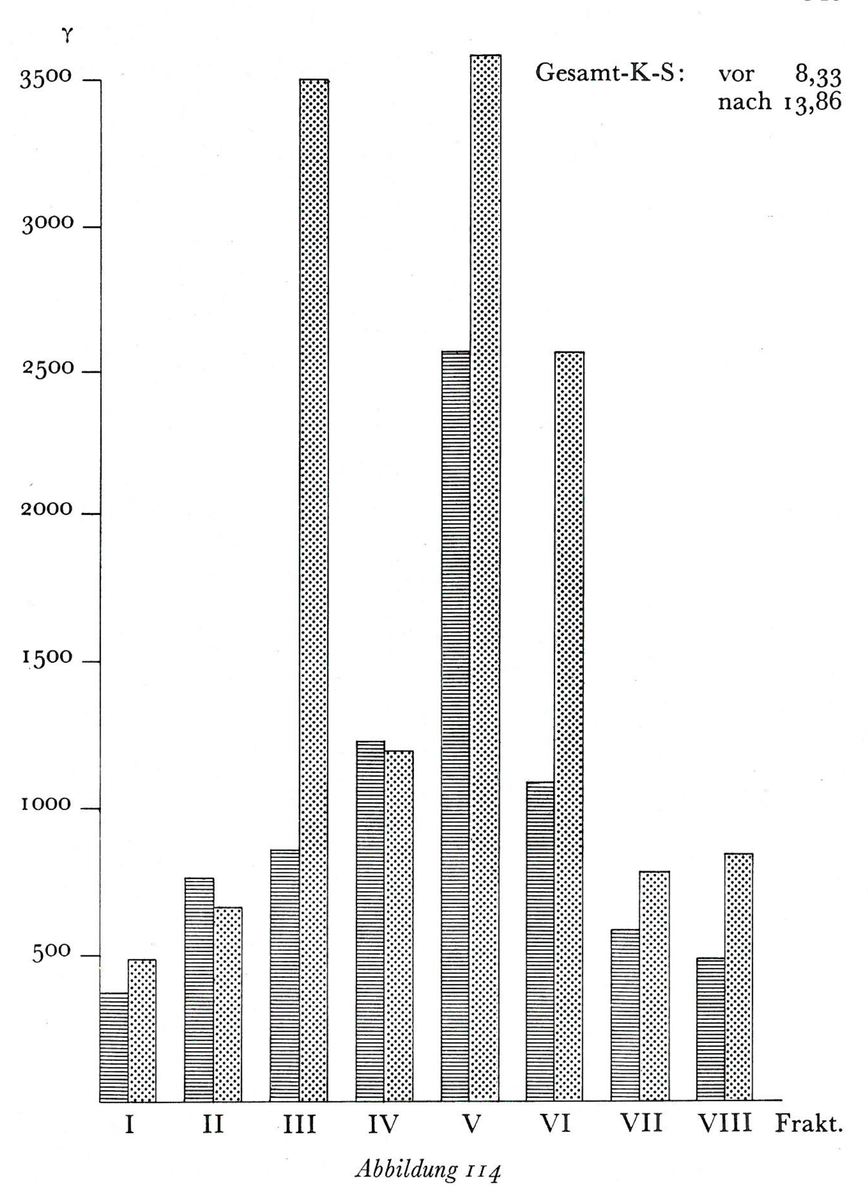


Abbildung 114

17-Ketosteroidausscheidung vor *und 15 Tage* nach *Injektion von Trockenzellen aus der* Nebenniere. *Mittelwert aus 22 Bestimmungen.*

▤ *vor* ▦ *nach*

(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)



γ
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500

Gesamt-K-S: vor 12,30 mg
nach 16,71 mg

I II III IV V VI VII VIII Frakt.

Abbildung 115

17-Ketosteroidausscheidung vor *und 12 Tage* nach *Injektion von Trockenzellen des* Testis. *Mittelwerte aus 10 Bestimmungen.*

▤ *vor* ▩ *nach*

(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)

Ein ganz anderes Bild zeigten die Bestimmungen der Mittelwerte vor und nach der Injektion von *Nebennieren-Trockenzellpräparaten.* Es wurden nur diejenigen Fraktionen vermehrt gebildet und ausgeschieden, die als Metabolite der Nebennierenhormone bekannt sind.

Nach Injektion von *Testis-Trockenzellen* zeigte sich ein stärkerer Anstieg derjenigen Fraktionen, von denen bekannt ist, daß sie aus-

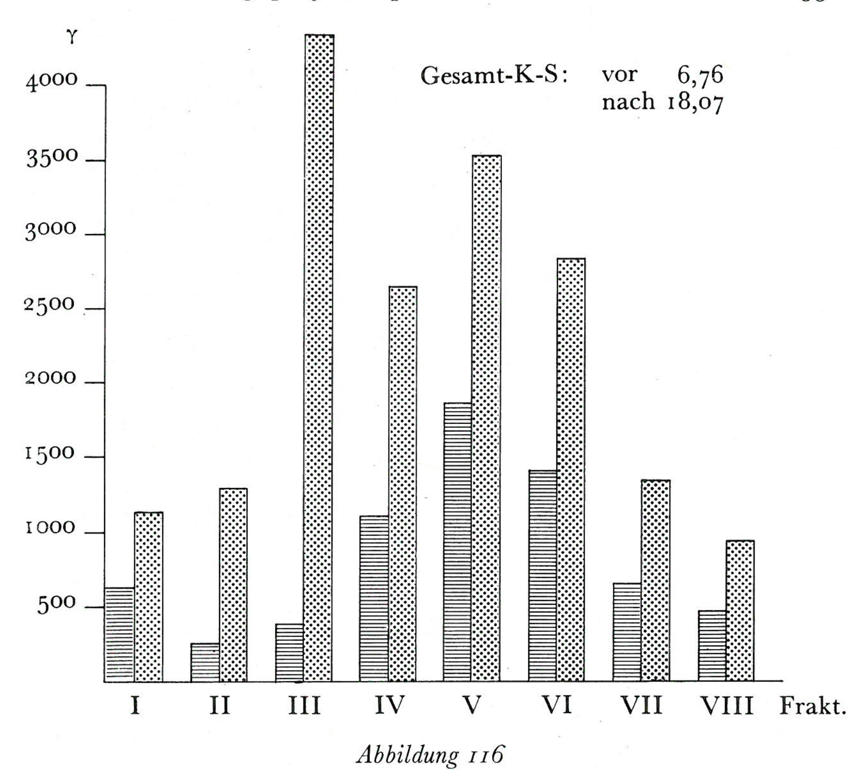


Abbildung 116
17-Ketosteroidausscheidung vor *und 14 Tage* nach *Injektion von Trockenzellen der* Placenta. *Mittelwerte aus 8 Bestimmungen.*
▤ *vor* ▩ *nach*
(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)

schließlich oder wenigstens zum größten Teil in den Hoden gebildet werden.

Ein Organ, das in der Zellulartherapie häufig verwendet wird, ist die *Placenta.* Die Placenta hat eine vielseitige innersekretorische Funktion. In der Placenta werden männliche und weibliche Keimdrüsenhormone sowie auch Hypophysen- und Nebennieren-Hormone gebildet. Wahrscheinlich hat die Placenta weitere endokrine Funktionen, die noch nicht bekannt sind. Es war interessant, auch die Wirkung von Placenta-Zellinjektionen auf die Ausscheidung der 17-Ketosteroidfraktionen zu untersuchen. Nach Placenta-Injektionen fand sich – ganz ähnlich wie nach der Implantation von

Hypophysenzellen – ein Anstieg aller 17-Ketosteroidfraktionen, der in der Quantität sogar den Effekt der Hypophyse übertraf.

Die endokrin stimulierende Wirkung der Implantation von Placentagewebe war auch schon von E. v. SCHUBERT (1954) nachgewiesen worden. Er prüfte den Einfluß von Placenta-Zellinjektionen auf das Vaginalepithel der postklimakterischen Frau. Um auszuschließen, daß es sich bei den Placentainjektionen um eine direkte Hormonwirkung handelte, untersuchte er zunächst die verwendeten Trockenzellpräparate auf ihren Gehalt an Sexualhormonen. Es wurde mit Sicherheit festgestellt, daß in dem Präparat «Siccacell»-Placenta weder Oestrogene noch Gonadotropine enthalten waren. Trotz des Fehlens direkt wirkender Hormone bewirkte die einmalige Injektion von 25 mg der in Ringerlösung aufgeschwemmten Placenta-Trockenzellen eine deutliche Stimulierung des Scheidenepithels postklimakterischer Frauen. Das Vaginalepithel wandelte sich in wenigen Tagen aus dem Stadium der Atrophie in den Zustand höheren Epithelaufbaues um.

Angeregt durch die Erfahrungsberichte von NIEHANS (1954) wird in der Zellulartherapie Gewebe des Hypothalamus in zunehmendem Maße verabfolgt. Den hypothalamischen Hirnzentren wird ein neurosekretorischer, steuernder Einfluß auf die inkretorische Funktion vor allem der Hypophyse zugeschrieben. KUHN und KNÜCHEL prüften, ob – gemessen an der Harnsteroidausscheidung – nach der *Injektion von Hypothalamuszellen* eine Änderung der endokrinen Funktion festzustellen sei. Eine eindeutige Wirkung der Hypothalamusgewebe in dieser Richtung war nicht zu beobachten. Wurden aber nach den Hypothalamuszellen Hypophysenzellen injiziert, so kam es zu einem charakteristischen, starken Anstieg aller 17-Ketosteroidfraktionen.

Die Beziehungen zwischen Hypothalamus und Hypophyse sind von GUILLEMIN und ROSENBERG (1956) untersucht worden: Sie führten Versuche durch an explantierten Hypophysenzellen, die in der Gewebekultur nur noch vier Tage ACTH produzierten. Später war im flüssigen Medium der Kultur ACTH nicht mehr nachweisbar (der ACTH-Nachweis erfolgte im SAYERS-Test an hypophysektomierten männlichen Ratten).

Wurden 15 bis 26 Tage nach Anlegen der Hypophysenkultur explantierte Hypothalamus-Zellen dazugegeben, nahmen die Hypo-

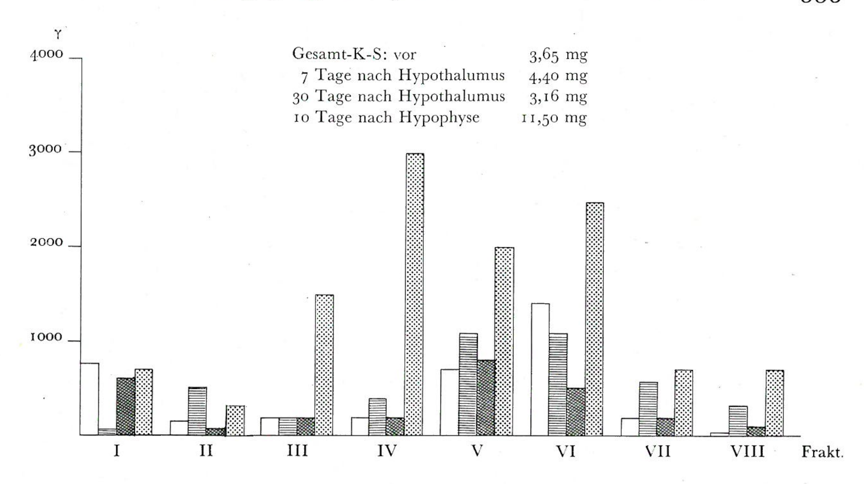


Abbildung 117
17-Ketosteroidausscheidung vor *sowie* nach Hypothalamus *und* nach Hypophyse.

☐ *vor Behandlung* ▤ *7 Tage nach Hypothalamus*
▨ *30 Tage nach Hypothalamus* ▩ *10 Tage nach Hypothalamus*

(Nach Knüchel und Kuhn, Medizinische Nr. 16: 587–593, 1955)

physenzellen ihre ACTH-Produktion wieder auf. Die hinzugefügten Hypothalamus-Zellen selbst enthielten oder produzierten von sich aus kein ACTH. Gab man zu den Hypophysenzellen Explantate von Hirnrinde, Leber oder Milz, so wurde die ACTH-Produktion nicht angeregt.

Aufschlußreiche Tierversuche über die Wirkung von Hypothalamusimplantaten auf die ovarielle Reife führte Donné (1962) durch. Es war beobachtet worden, daß gewisse Läsionen des Hypothalamus zu einem Zustand führen, der einer «Pubertas praecox» ähnelt. Von dieser Erfahrung ging Donné bei seinen Versuchen aus. Als Kriterien für die sexuelle Entwicklung wurde bei weiblichen Wistar-Ratten die Öffnung der Vagina und die ovarielle Reifung geprüft. Die spontane Pubertätsentwicklung ist bei Wistar-Ratten aus zahlreichen Versuchen genau bekannt. Bei diesen Tieren öffnet sich die Vagina normalerweise zwischen dem 35. und 55. Lebenstag, während die ovarielle Reifung zwischen dem 65. und 88. Lebenstag liegt.

Als Implantate wurden isologe Hypothalamus-Gewebe verwendet. Die Versuche wurden mit unmittelbar übertragenem, «frischem» Hypothalamus und mit gefriergetrockneten Hypothalamuspräparaten durchgeführt.

Um auszuschließen, daß es sich um eine unspezifische Wirkung handelte, wurden in einem Vorversuch andere Gehirnregionen (Frontallappen, Parietallappen, Occipitallappen) implantiert und daneben auch Gewebe, die nicht aus dem ZNS stammten (Muskel, Leber usw.). Nach der Injektion nicht hypothalamischer Gewebe wurde – im Gegensatz zu den Hypothalamus-Implantaten – niemals eine vorzeitige vaginale Öffnung beobachtet.

Die Implantationen erfolgten bei unreifen Ratten in einem Lebensalter von 30 bis 32 Tagen. Eine einmalige Hypothalamusüberpflanzung bewirkte bei 80% der Tiere eine vorzeitige Vaginaöffnung in weniger als 24 Stunden. Meistens öffnete sich die Vagina schon nach 10 bis 18 Stunden. In 20% der Fälle lag die Eröffnungszeit zwischen 24 und 36 Stunden. Bei einer Vergleichsgruppe, der Hypophyse implantiert worden war, folgte in allen Fällen die Eröffnung erst nach 36 Stunden und später.

Die vaginale Öffnung war aber nicht der Ausdruck einer Pubertas praecox, denn die Vaginalabstriche waren hypotrophisch und die ovarielle Reifung folgte verzögert.

In einer zweiten Versuchsserie wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen je eine Einzelimplantation von Hypothalamus vorgenommen. Danach kam es nicht nur zu einer früheren Vaginaöffnung, sondern auch zu einer vorzeitigen ovariellen Reife.

Einzelimplantationen an 12 aufeinanderfolgenden Tagen ergaben hinsichtlich vaginaler Öffnung und ovarieller Reifung analoge Befunde, jedoch nekrotisierten die Implantate vom 7. Tage an und wurden abgestoßen.

Als Wirkung der Hypothalamus-Implantationen wurden auch histologisch sichtbare Änderungen der Nebenniere beobachtet, die ein Zeichen einer größeren funktionellen Aktivität waren. Dabei schien es, daß die adrenalen Reaktionen der ovariellen Entwicklung vorausgingen.

Die Verwendung von gefriergetrockneten Hypothalamusgeweben brachte nicht nur analoge Resultate, sondern – da hiervon größere Mengen gegeben werden konnten – auch deutlich stärkere

Wirkungen. So konnte durch Einzelinjektionen von lyophilisiertem Hypothalamus an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine echte Pubertas praecox bei unreifen Tieren ausgelöst werden. Die so behandelten Ratten wurden in einem Alter von 35 bis 36 Tagen mit Männchen zusammengebracht, konzipierten und warfen am 68. bis 69. Lebenstag. Die Kontrolltiere wurden nur ausnahmsweise und dann erst am 61. bis 64. Tag trächtig. DONNÉ zog aus seinen Versuchen den Rückschluß, daß die Nebenniere eine wichtige Rolle beim Determinismus der vaginalen Öffnung spielt, daß aber andererseits die Öffnung der Vagina kein spezifisches Zeichen für den Eintritt der Pubertät ist. Zur weiteren Klärung führte er Versuche an *adrenalektomierten* Ratten durch. Je nachdem, ob die Adrenalektomie vor oder nach dem 32. Lebenstage durchgeführt wurde, kam es nach Hypothalamusimplantation zu einer ziemlich raschen (3 bis 4 Tage) oder stark verzögerten (70 bis 120 Tage) vaginalen Öffnung. In beiden Fällen fehlten Zeichen ovarieller Stimulierung. Die Reifung des Ovars selbst erfolgte verzögert, mit gestörter zyklischer Tätigkeit. Die Wirkungsunterschiede in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Adrenalektomie erklärte DONNÉ aus der Reifung akzessorischer Nebennieren.

Eine Gegenprobe wurde durchgeführt mit Nebennierenimplantaten, die von adulten Tieren stammten. Sie führten zu analogen Resultaten wie die Hypothalamusimplantate. Es ist demnach wahrscheinlich, daß die Nebenniere der unentbehrliche Mittler für die Wirkung der Hypothalamusimplantate ist.

Eine Vermittlung dieser speziellen Hypothalamuswirkung durch die Hypophyse hält DONNÉ für unwahrscheinlich, denn die vaginale Eröffnung vollzog sich auch bei hypophysektomierten Tieren.

Aus den DONNÉschen Experimenten läßt sich schließen, daß es eine *echte* Pubertas praecox hypothalamischen Ursprungs gibt. Diese aufschlußreichen Versuche werden weitergeführt. Es ist zu hoffen, daß diese Grundlagenforschung weitere Erkenntnisse für die Wirkungsweise implantierter Hypothalamusgewebe ergibt.

In der Anwendung von Hypothalamusgewebe ist die zellulartherapeutische Empirie der Grundlagenforschung vorausgeeilt. Seit 1948 hat NIEHANS Zellaufschwemmungen des Hypothalamus von Feten oder von jungen Tieren mit Erfolg bei Störungen der zentralen vegetativen Steuerung implantiert. Er erkannte zunehmend die

Wichtigkeit dieses zentralen Organs und behandelte immer mehr hypothalamische Regulationsstörungen mit korrespondierenden Zellen. Unter mehreren Kasuistiken, die er 1952 erstmalig publizierte, sind folgende Fälle interessant:

«Eine junge Frau, geplagt durch lästige Schweißsekretion, mußte dreimal täglich ihr Hemd wechseln und stets ihre Hand trocknen, bevor sie sie reichen konnte. 7 Wochen nach Injektion von Hypothalamuszellen war die Schweißsekretion normalisiert. Nachbeobachtungszeit: 6 Jahre.»

«Ein Knabe, der nach einem Schreck einen Diabetes mellitus bekam, schied nach Injektion von Hypothalamuszellen keinen Zucker mehr aus.»

In letzterem Falle hatte NIEHANS den Diabetes nicht mit Pankreaszellen behandelt, sondern mit Hypothalamuszellen, weil auf Grund der Anamnese eine hypothalamische Genese anzunehmen war.

Die Beziehungen zwischen dem System Hypothalamus-Hypophyse und den Pankreasinseln sind bekannt. Die Abhängigkeit des Kohlehydrat-Stoffwechsels von zentralnervösen Steuerungszentren wurde entdeckt durch den «Zuckerstich» von Claude BERNARD (1853). Durch eine Verletzung in der Gegend des 4. Ventrikels konnte er eine experimentelle Glykosurie hervorrufen. Später zeigten andere Forscher, daß lokale Läsionen der Zwischenhirnzentren zu dem gleichen Ergebnis führen (ASCHNER und andere). Auf Grund dieser Befunde galt noch ein halbes Jahrhundert nach der Entdekkung Claude BERNARDS der Diabetes als «funktionelles Leiden des zentralen Nervensystems». Erst als VON MEHRING und MINKOWSKI den experimentellen Pankreasdiabetes entdeckten, formte sich die Theorie von der Pankreasschädigung als der Ursache des Diabetes. Jeder echte Diabetes wurde nur noch als primäre Pankreaserkrankung angesehen und der «neurogene» Diabetes gänzlich abgelehnt. In neuerer Zeit bewegte sich das Pendel allerdings wieder zum anderen Ende dieser entgegengesetzten Meinungen. VEIL und STURM sahen erneut eine Funktionsstörung des Zwischenhirns als Kern der Pathogenese des Diabetes an. Die Auffassung, die Zuckerkrankheit sei ausschließlich oder überwiegend zentralnervös bedingt, und es handle sich dabei um eine «Diencephalose», stand in dieser verallgemeinernden Form allerdings auch auf schwachen Füßen. Man kann den heutigen Stand der Auffassungen etwa folgendermaßen

zusammenfassen: Eine funktionelle Störung oder eine isolierte lokale Erkrankung der vegetativen Zentren ist nur selten als Ursache eines Diabetes anzusehen. Gelegentlich kann aber eine derartige Störung als auslösender Faktor bei einem an sich labilen Zuckerhaushalt (Praediabetes) wirken.

Die unterschiedlichen Auffassungen in der Pathogenese des Diabetes haben sich naturgemäß auf die Therapie ausgewirkt. Sie beeinflußten bis zu einem gewissen Grade auch die Versuche, die Zuckerkrankheit durch Zellimplantationen zu heilen.

Bis vor etwa zwei Jahren waren die therapeutischen Ergebnisse der Implantation von Zellen des Pankreas oder der Gehirnzentren bei Diabetes recht mager. Manchmal kam es danach sogar zu vorübergehenden Entgleisungen des KH-Stoffwechsels. In letzter Zeit haben sich aber experimentelle Befunde ergeben, die zu der Hoffnung berechtigen, daß sich durch Zellimplantationen doch neue Wege in der Therapie des Diabetes eröffnen könnten.

Die Zuckerkrankheit wird bisher mit Diät, Insulin und den oralen Antidiabetika behandelt.

Daß die Sulfonylharnstoffe für bestimmte Formen des Diabetes einen therapeutischen Fortschritt bedeuten, steht fest. Aber ein abschließendes Urteil kann noch nicht gegeben werden. Endgültiges über Wert und Unschädlichkeit wird erst dann ausgesagt werden können, wenn die Sulfonylharnstoffe jahrzehntelang erprobt worden sind.

Wir wissen jedoch bereits, daß die oralen Antidiabetika beim Insulinmangel-Diabetes, dem Pankreas-Diabetes im engeren Sinne, kaum wirken. Der Insulinmangel-Diabetes ist aber die gefährlichere Form, mit einer B-Zellen-Verminderung im Inselapparat, auf deren therapeutische Beherrschung es uns ankommt, weil davon die jugendlichen Zuckerkranken betroffen sind. Mit Insulin läßt sich ein Pankreas-Diabetes kompensieren. Die ideale Lösung ist mit der Insulintherapie aber auch noch nicht gefunden. Alexis CARREL hat gesagt: «Insulin heilt keine Zuckerkranken. Diese Krankheit wird erst bezwungen, wenn es uns gelingt, die Inselzellen zu erneuern oder zu ersetzen. Im Pankreas die Regeneration der Langerhansschen Inselzellen zustande zu bringen, wäre eine viel schlagkräftigere Art, Diabetes zu behandeln, als täglich dem Körper des Kranken Insulin einzuspritzen.»

Dieses Ziel der Regeneration des Inselapparates hat sich NIEHANS gesetzt, als er bereits in den Anfängen der Zellulartherapie versuchte, den Diabetes durch Injektions-Implantation von Pankreaszellen zu beeinflussen. NIEHANS injizierte *fetale* Pankreaszellen, weil damals noch die Ansicht herrschte, daß die exkretorischen Zellen vom Pankreasgewebe eines adulten Tieres an der Injektionsstelle einen Verdauungsabszeß auslösen würden. Im *fetalen* Pankreas hingegen sind die exkretorischen Verdauungszellen noch inaktiv, während die Inselzellen schon frühzeitig ihre Tätigkeit aufnehmen. Die Annahme, daß die intramuskuläre Injektion einer Aufschwemmung von totalem Pankreas eines adulten Tieres unbedingt zu einem Verdauungsabszeß führen müsse, hat sich inzwischen als Irrtum erwiesen. K. NEUMANN hat 1959 im Tierversuch gezeigt, daß die intramuskuläre Injektion von adultem Pankreasgewebe reaktionslos vertragen wird. Theoretisch ist unter physiologischen Verhältnissen eine Andauung der Muskulatur auch gar nicht zu erwarten, weil die proteolytischen Enzyme im Pankreas nicht in aktiver Form vorliegen.

In der Folgezeit wurden Versuche mit Pankreasgewebe adulter Tiere auch bei Patienten gemacht. Eine Proteolyse am Injektionsort trat tatsächlich nicht ein. Damit ergaben sich bessere Möglichkeiten für die Zellulartherapie des Diabetes. In der Pankreasinsel des Feten finden sich A-Zellen und B-Zellen im Verhältnis von 50:50. Bald nach der Geburt hingegen ändert sich die Relation in 80% B-Zellen zu 20% A-Zellen. Auf das Zahlenverhältnis von A- zu B-Zellen scheint es aber bei der Zellulartherapie des Diabetes anzukommen. Der Antagonismus zwischen A- und B-Zellen innerhalb der Pankreasinseln ist heute einigermaßen geklärt. DUNN und seine Mitarbeiter hatten 1943 festgestellt, daß durch parenterale Zufuhr von Alloxan ein Diabetes hervorgerufen wird, weil das Alloxan selektiv die Pankreasinseln angreift. Die weiteren Forschungen über den Alloxan-Diabetes und die Differenzierung der Inselzellen durch eine spezielle Granula-Färbung haben in jüngster Zeit eine genauere Analyse der Inselfunktion ermöglicht. Man kann durch Silberimprägnierung zwei verschiedene Zelltypen in den Pankreasinseln unterscheiden, weil die Granula der A-Zellen durch Silber geschwärzt werden, während die B-Zellen hell bleiben.

Es ergab sich nun, daß bei manchen Zuckerkranken ein charakteristischer Schwund der B-Zellen vorliegt und daß auch die Allo-

xan-Vergiftung selektiv die B-Zellen schädigt und die A-Zellen verschont. Demnach ist anzunehmen, daß die B-Zellen den insulinaktiven Anteil der Inseln darstellen. Bei juvenilen Formen des Insulinmangel-Diabetes – bei denen durch ältere Färbemethoden keine histologischen Unterschiede erkannt werden konnten – läßt sich durch die neuen Verfahren nachweisen, daß doch schwere Schädigungen der B-Zellen vorliegen. Auch bei experimentell durch somatotropes Hormon der Hypophyse erzielten Dauerdiabetesformen läßt sich als regelmäßiger Befund in der Bauchspeicheldrüse ein Schwund der B-Zellen beobachten. Diese Verschiebung der A-B-Relation zuungunsten der B-Zellen ist nach neuesten Untersuchungen – hauptsächlich durch FERNER – eine wesentliche Ursache für den Diabetes mellitus. Dabei ist nach den letzten Arbeiten anzunehmen, daß nicht nur der Schwund der B-Zellen von pathogenetischer Bedeutung ist, sondern ebensosehr die Vermehrung der A-Zellen. Aus Untersuchungen von SUTHERLAND und CORI sowie DE DUVE, von GAEDE und CASTROP wissen wir, daß in den A-Zellen ein hyperglykämisierender Stoff gebildet wird, der wohl dem Glukagon von BÜRGER entspricht. Das Glukagon hat seinen Angriffspunkt im Leberglykogen und ist in seiner Wirkung vergleichbar dem Adrenalin.

Aus diesen Erkenntnissen ergab sich für die Zellulartherapie des Diabetes die Forderung, Präparate mit einem hohen Anteil an B-Zellen und möglichst ohne A-Zellen einzusetzen. Beim Pankreasgewebe von Tierfeten ist diese Voraussetzung nicht gegeben, da hier – wie gesagt – A- und B-Zellen in einem Verhältnis von 50:50 stehen. Daraus mag sich erklären, warum mit Injektionen vom fetalen Pankreas des Tieres beim Diabetes relativ wenig erreicht wurde. Etwas besser waren die Resultate, wenn Pankreasgewebe von menschlichen Feten im Alter von 5 bis 7 Monaten verwendet wurde. NIEHANS hat 1952 Zellen aus der Bauchspeicheldrüse eines menschlichen Feten therapeutisch bei einem Diabetes mellitus eingesetzt und über verhältnismäßig gute Wirkungen berichtet.

Angeregt durch diese Beobachtungen von NIEHANS hat SCHENCK weitere Therapieversuche mit humanfetalen Pankreaszellen beim Diabetes durchgeführt. Die Voraussetzungen hierfür waren recht schwierig, weswegen die Zahl der Fälle gering blieb. Grundsätzlich sind für zellulartherapeutische Zwecke nur Feten verwertbar, die

aus einer lege artis in einer Klinik vorgenommenen Interruptio stammen. Geeignetes humanfetales Zellmaterial steht nur sehr selten zur Verfügung, so daß diese Methode nie eine Bedeutung erlangen kann. SCHENCK hat 12 Diabetiker mit humanfetalem Pankreasgewebe behandelt. Bei diesen Therapieversuchen ist zu berücksichtigen, daß das Pankreas eines etwa 5 Monate alten menschlichen Feten noch sehr klein ist und daß man wahrscheinlich nicht ausreichende Mengen überpflanzt. Obwohl aus der geringen Zahl der Fälle keine allgemeingültige Folgerungen gezogen werden können, mißt SCHENCK der Therapie mit humanfetalen Pankreaszellen eine gewisse theoretische Bedeutung bei.

Von insgesamt 65 Patienten, die SCHENCK mit humanem oder tierischem fetalem Pankreas behandelte, zeigten 31 eine bessere Toleranz für Kohlehydrate. Bei diesen Patienten konnte die gewohnte Insulinmenge reduziert oder weggelassen werden. Ein bis dahin labiler KH-Stoffwechsel stabilisierte sich, und Begleiterscheinungen des Diabetes schwanden. Die günstigsten Resultate wurden bei älteren Patienten erreicht. Die Dauer der therapeutischen Wirkung war unterschiedlich. Im allgemeinen betrug sie mehrere Monate, in einigen Fällen auch über ein Jahr.

Es ist aufschlußreich, daß SCHENCK die besten Wirkungen beobachtete, wenn tierische fetale Pankreaszellen kombiniert wurden mit Placenta, Leber und Hypothalamus sowie beim Altersdiabetes auch mit Keimdrüse.

Durch die Initiative von NIEHANS setzte seit März 1959 eine intensive Grundlagenforschung ein mit dem Ziel, angereicherte B-Zellen-Präparate zu gewinnen. Die Experimente wurden hauptsächlich von K. NEUMANN, Köln, durchgeführt. Es wurde versucht, therapeutisch wirksame Zellpräparate zu gewinnen entweder durch Anreicherung der B-Zellen oder durch ihre Isolierung aus dem Pankreas oder aber durch Eliminierung der antagonistisch wirkenden A-Zellen aus den Inseln. Mechanische Verfahren zur Abtrennung der B-Zellen bewährten sich nicht. Es wurden dann noch chemisch-pharmakologische und biologische Methoden versucht, um die A-Zellen auszuschalten und die B-Zellen anzureichern. Die Prüfung der therapeutischen Wirksamkeit derartiger Zellpräparate erfolgte am künstlich durch Alloxan erzeugten Diabetes des Versuchstieres. Die sehr schwierigen Experimente blieben lange Zeit ohne positive

Ergebnisse. Ergebnislos war auch ein Versuch, der gemacht wurde mit einem reinen B-Zellpräparat, gewonnen aus einem Inselzell-Adenom, welches an einer chirurgischen Universitätsklinik operativ entfernt worden war.

Therapeutische Wirkungen im Tierversuch wurden erst gesehen, als Pankreasgewebe von einem hochträchtigen Schaf injiziert wurde. Aus einer Publikation von ALLEGRETTI (1956) war bekannt, daß bei hochträchtigen Schafen der B-Zellanteil in den Pankreasinseln erhöht ist. FERNER prüfte die Angaben von ALLEGRETTI nach und konnte bestätigen, daß im Pankreas hochträchtiger Schafe der B-Zellanteil von normalerweise 80% auf 92–95% ansteigt.

Bei der tierexperimentellen Prüfung der antidiabetischen Wirkung von Pankreasgewebe eines hochträchtigen Schafes ging K. NEUMANN von der Beurteilung der Blutzuckerwerte, der täglichen Harnmenge und der Zuckerausscheidung im Harn aus. Nach Injektion einer relativ hohen Dosierung von 15 mg Pankreaszellen je Tier kam es bereits am 5. Tage nach der Injektion zu einer Senkung der vorher pathologisch erhöhten Blutzuckerwerte um 43% im Mittel gegenüber den Kontrolltieren. Die tägliche Harnmenge der Versuchstiere wurde ebenfalls deutlich zum Günstigen hin beeinflußt. Die Zuckerausscheidung im Harn blieb allerdings im wesentlichen unverändert.

Nachdem im Tierversuch nicht nur die Unschädlichkeit, sondern auch eine gewisse therapeutische Wirksamkeit gefriergetrockneten Pankreasgewebes vom hochträchtigen Schaf nachgewiesen war, wurden auch Versuche am Menschen gemacht. NIEHANS selbst führte die ersten Versuche am Patienten durch. Er verwendete dabei nicht nur Trockenzellen vom Pankreas hochträchtiger Schafe, sondern in letzter Zeit auch zunehmend Frischzellen. Wenn ein tragendes Schaf getötet wurde, um Frischzellen vom Feten zu gewinnen, entnahm NIEHANS gleichzeitig das Pankreas des Muttertieres. Seine ersten Erfahrungen mit dieser Zellulartherapie des Pankreas hat NIEHANS im November 1960 publiziert. Seitdem übersieht er zahlreiche weitere Fälle, deren Ergebnisse er noch nicht veröffentlicht hat. In einer persönlichen Mitteilung hat NIEHANS seine Beurteilung folgendermaßen zusammengefaßt: Bei leichten Fällen von Diabetes, insbesondere beim Altersdiabetes, genügte eine Injektion von 40 cm^3 Frischzellaufschwemmung aus dem Pankreas hochträch-

tiger Schafe, um die Zuckerkrankheit so zu bessern, daß die Patienten insulin-unabhängig wurden. Bei mittelschweren Fällen von Diabetes mußte er in der Dosis viel höher gehen, um den gleichen Effekt zu erreichen. Bei schweren Diabetesfällen, vor allem beim pankreatogenen Insulinmangel-Diabetes, hat er noch keinen Erfolg gehabt. Er führt das darauf zurück, daß die Dosis nicht ausreichte. NIEHANS ist der Meinung, daß auch der Insulinmangel-Diabetes auf diese Therapie ansprechen würde, wenn man B-Zellen in genügender Konzentration injizieren könnte.

Bei dieser Zellulartherapie des Diabetes ist aber zu berücksichtigen, daß selbst bei einem Anteil von 95 % B-Zellen innerhalb der Pankreasinseln die absolute Menge an B-Zellen sehr gering ist, weil alles Inselgewebe zusammen nur etwa 2 % des Gesamtpankreas ausmacht. NIEHANS ist daher der Auffassung, daß es darauf ankommt, reine B-Zellpräparate in ausreichender Menge zu gewinnen.

Gefriergetrocknete Zellen des Gesamtpankreas vom hochträchtigen Schaf wurden inzwischen auch von UHLENBRUCK, KLEINSORGE und SCHENCK geprüft. In der Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit stimmten die drei Autoren überein: Sie sahen nicht so gute Wirkungen wie NIEHANS. Immerhin wurden aber auch bei diesen klinischen Versuchen Wirkungen beobachtet, die zeigten, «daß sich etwas tut». UHLENBRUCK faßte es so zusammen, daß eine Wirkung im Sinne einer Blutzuckersenkung beobachtet wurde, die zunächst für einige Tage einsetzte und dann zu einer Gegenregulation führte, wobei der Blutzucker über die vorher gemessenen Werte anstieg. Spätbeobachtungen stehen noch aus.

Tierexperimentelle Versuche und klinische Prüfungen haben also gezeigt, daß Zellpräparate des Pankreas, in denen die B-Zellen angereichert sind, eine leichte therapeutische Wirkung haben. Diese Beobachtung wird in ihrer grundsätzlichen Bedeutung bestätigt durch tierexperimentelle Ergebnisse, die DUBOIS und GONET 1961 veröffentlicht haben. Am Institut für Histologie und Embryologie der Universität Genf lösten die beiden Autoren bei männlichen Albinoratten einen schweren experimentellen Diabetes aus, entweder durch Injektion von hohen Dosen Alloxan oder aber durch subtotale Pankreatektomie. Eine totale Pankreatektomie war bei diesen Ratten nicht möglich, weil entlang des Ductus Wirsungiani bis zum Duodenum hin einzelne kleine Acini des Pankreas ziehen, die

man nicht herausoperieren konnte, ohne das Tier zu töten. Diese geringen Pankreasreste, die aus anatomischen Gründen bei der Resektion belassen werden mußten, spielen aber funktionell keine Rolle.

Die Alloxanvergiftung oder die Pankreatektomie erzeugten jedesmal bei den Versuchstieren innerhalb von 24 bis 48 Stunden eine schwere Hyperglykämie, verbunden mit Glykosurie und Ketonurie und führten innerhalb von kurzer Zeit zum Tode.

Dubois und Gonet gelang es, diesen experimentellen Diabetes zu beherrschen, wenn sie Versuchstieren Pankreas von 19 Tage alten Rattenfeten oder von neugeborenen Ratten – die jünger als 6 Stunden waren – intratestikulär einpflanzten. Die Implantation geschah intratestikulär, weil praktisch damit in eine Peritonealtasche eingepflanzt wurde. Der Erfolg dieser Implantation von fetalem Rattenpankreas war aufsehenerregend. Die Versuchstiere normalisierten in einer Zeit von 24 Stunden bis zu 3 Tagen danach den Blutzucker und überwanden in der Folgezeit den experimentellen Diabetes vollkommen.

Bei diesem Experiment wurden B-Zellen und exokrine Zellen des fetalen Pankreas überpflanzt. A-Zellen waren nicht dabei. Bei Rattenfeten entwickeln sich die B-Zellen der Pankreasinseln zwischen dem 15. und 16. Tag des intrauterinen Lebens und erst am 19. Tag sind die B-Zellen granuliert, als Zeichen, daß sie Insulin produzieren. Die A-Zellen in den Pankreasinseln der Rattenfeten hingegen differenzieren sich erst 16 bis 18 Stunden nach der Geburt. Wenn man also Pankreas von 19 Tage alten Rattenfeten oder aber von frischgeborenen – noch nicht 6 Stunden alten Ratten – verwendet, so enthalten die Inseln nur B-Zellen. Da man Gesamtpankreas nehmen mußte, waren auch noch exokrine Zellen in dem Implantat, die aber nicht störten und nach wenigen Tagen atrophierten.

Die Versuchstiere wurden dann in Zeitabständen von 48 Stunden bis zu 6 Monaten nach der Pankreaszellüberpflanzung getötet, um histologisch untersucht zu werden. Dubois und Gonet stellten fest, daß am Implantationsort die B-Zellen proliferierten und Insulin sezernierten. In einzelnen Fällen wuchsen die Implantate bis zu einer Größe von 3 mm Durchmesser. In der Folgezeit trat eine Involution der Implantate ein, und im Laufe des 2. Monats nach der Überpflanzung fand man am Ort der Einpflanzung nur noch bindegewebige Granulationen mit einzelnen verstreuten endokrinen Drü-

senzellen. Der Kohlehydratstoffwechsel der Versuchstiere blieb trotzdem normal, weil sich inzwischen am normalen Pankreassitz das in geringer Menge verbliebene Pankreasgewebe regeneriert hatte. Die Regenerate zeigten eine makroskopisch atypische Morphologie, waren aber im histologischen Bild durchaus dem normalen Pankreasgewebe vergleichbar.

Dieses bedeutsame Experiment von Dubois und Gonet zeigt, daß es grundsätzlich möglich ist, eine schwere chemische oder mechanische Schädigung des Pankreas durch Überpflanzung von fetalen Pankreaszellen zu heilen. Damit ist die von Niehans 1952 publizierte Konzeption der Zellulartherapie des Diabetes durch das Tierexperiment im Prinzip bestätigt und erweist sich als vereinbar mit den heute geltenden theoretisch-wissenschaftlichen Auffassungen von der Zuckerkrankheit.

Nunmehr kommt es bei den weiteren Versuchen darauf an, den therapeutisch unnötigen exokrinen Teil des Pankreas aus den Zellpräparaten zu entfernen und den Anteil an B-Zellen zu steigern – oder sogar möglichst reine B-Zellpräparate zu gewinnen. Die antagonistisch wirkenden A-Zellen der Pankreasinseln müssen eliminiert werden.

Wenn es gelingt, reine B-Zellpräparate zu gewinnen, wird es sich erweisen, ob damit ein Insulinmangel-Diabetes geheilt werden kann. Vielleicht werden aber in der Zellulartherapie des Diabetes außer den B-Zellen auch andere Zellarten eingesetzt werden müssen. Es darf nicht vergessen werden, daß der Inselapparat des Pankreas von einem komplizierten System vegetativer Regulationen abhängt. An der Steuerung des Kohlehydrathaushaltes sind außer dem endokrinen Pankreas beteiligt:

Großhirn und Psyche, die vegetativen Zentren im Zwischenhirn, die Hypophyse mitihrem adreno-corticotropen Hormon (ACTH) und dem somatotropen Hormon (STH), die Nebennieren mit dem Adrenalin und den Glukokortikoiden, die Schilddrüse mit dem Thyroxin – das eine Hyperglykämie und vielfach auch eine Glykosurie herbeiführen kann – und die Keimdrüsen, die ebenfalls einen Einfluß auf den KH-Stoffwechsel haben können. (Wir wissen, daß zum Beispiel im Klimakterium ein Diabetes auftreten kann.) In diesem Zusammenhang ist auch die Leber zu erwähnen, die in der Regulation des Blutzuckers eine große Rolle spielt.

Wenn alle diese Faktoren bei der Entstehung und dem Verlauf eines Diabetes mellitus beteiligt sind, dann werden sie auch wahrscheinlich bei der Zellwahl für die Zellulartherapie des Diabetes berücksichtigt werden müssen – in einer auf jeden Patienten individuell angepaßten Weise. Es wäre falsch, die Zellulartherapie des Diabetes einseitig auf die Pankreasinseln und den Antagonismus zwischen A- und B-Zellen auszurichten. Dafür ist die Zuckerkrankheit ein zu komplexes Geschehen, von dem wir noch zu wenig wissen.

Anmerkung während der Korrektur:

Als sich dieses Buch bereits im Umbruch befand, erschien eine Publikation von U. Haenel, W. Schneider und Hj. Staudinger «Zur organspezifischen Wirkung von Trockenzellpräparaten» (Dtsch. med. Wschr. 87, S. 2481–2485, 1962). Die Verfasser beziehen sich auf die Versuche von Kuhn und Knüchel zur Harnsteroidausscheidung nach Injektion von Gewebe innersekretorischer Drüsen und kommen zu der Schlußfolgerung, daß sie «bei Applikation von Trockenzellen (Siccacell) endokrin und nicht endokrin tätigen Gewebes (NNR, Testes, Leber) keinerlei spezifische Wirkung anhand von Veränderungen der 17-Ketosteroid- und der Corticoidausscheidung im Urin nachweisen konnten».

Kuhn und Knüchel werden an anderer Stelle noch selbst ausführlich auf diese Publikation erwidern. Hier sei nur festgestellt, daß die Befunde von Haenel, Schneider und Staudinger die früheren Versuchsergebnisse von Kuhn und Knüchel *nicht widerlegen*, weil:

1. die Anzahl der von Haenel et al. in die Versuche einbezogenen Patienten zu klein war;
2. unterschiedliche und in ihren Ergebnissen nicht vergleichbare Methoden zur Hormonbestimmung angewendet wurden. Während Kuhn und Knüchel die saure Hydrolyse benutzt hatten, verwendeten Haenel et al. die enzymatische Hydrolyse;
3. die von Haenel et al. ausgewählten Patienten für diese Untersuchungen untauglich waren. Kuhn und Knüchel hatten ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die organspezifische Stimulierung durch korrespondierende Zellen nur dann wirksam wird, wenn das zu behandelnde Organ sich in Unterfunktion befindet. Auf diese Tatsache wird in anderen Zusammenhängen von mehreren Mitautoren dieses Buches wiederholt hingewiesen. Haenel et al. wählten Patienten aus, «die längere Zeit bettlägerig, sonst aber endokrin gesund waren». Es handelte sich «ausnahmslos um Ulcuskranke». Ulcus-Patienten sind aber auch aus anderen Gründen für diese Art von Versuchen ungeeignet.

Die Versuchsergebnisse von Haenel, Schneider und Staudinger sind also – soweit sie in Vergleich zu den Befunden von Kuhn und Knüchel gesetzt und zur allgemeinen Beurteilung zellulartherapeutischer Wirkungen herangezogen werden – nicht wertbar.

Beeinflussung experimenteller Leberschädigungen durch Gewebeinjektionen

VON PRIVATDOZENT DR. K. NEUMANN, KÖLN

1. Einführung

Versuche, die therapeutische Wirkung von Gewebeinjektionen durch die Heilung experimentell herbeigeführter Leberschädigungen objektiv und reproduzierbar darzutun, gehören zu den ältesten tierexperimentellen Arbeiten auf dem Gebiet der Zellulartherapie. Schon 1954 hat HARBERS über Versuche berichtet, durch Tetrachlorkohlenstoff künstlich herbeigeführte Leberschäden bei Ratten durch Frisch- oder Trockenzelleninjektion zu beeinflussen. Fast gleichzeitig folgten 1958 und 1959 die Untersuchungen von HARDEGG und MAASS, von RIETSCHEL sowie von OETZMANN.

Außer prophylaktischen und kurativen Tests bei experimenteller Leberschädigung liegen Untersuchungen allgemeiner Art vor, in denen bemerkenswerte und oft spezifische Reaktionen der Leber auf parenterale Inkorporierung von Lebergewebe beobachtet wurden. Ein großer Teil dieser Arbeiten wurde unabhängig von aktuellen Fragen der Zellulartherapie durchgeführt.

2. Mitoserate der Leber nach Gewebeinjektionen

Die Zellteilungsaktivität (Mitoserate) in der Rattenleber sinkt normalerweise von etwa 10 Promille in den ersten drei Lebenswochen bis auf etwa 0,05 Promille im zweiten Lebensmonat ab. TEIR und Mitarbeiter (1951 bis 1954) haben gezeigt, daß die Injektion von Lebergewebe zwei Wochen alter Ratten nach 48 Stunden zu einer eindeutigen Steigerung der Mitosezahl in der Leber der Empfängertiere führt. Wurde Lebergewebe von 12 Monate alten Ratten injiziert, so war eine Steigerung der Mitoserate nicht feststellbar. Einen Überblick über die Versuchsresultate gibt die folgende Tabelle.

Die Untersuchungen zeigen in einer sehr eindrucksvollen Weise, daß abhängig vom Alter des Spendertieres eine Erhöhung der Mitoserate im Erfolgsorgan herbeigeführt wird. Eine Dosisabhängig-

Tabelle 17

Wirkung der Injektion von Lebergewebe auf die Mitoserate (°/₀₀) der Empfängertiere (zusammengestellt nach Ergebnissen von Teir)

	Höhe der Mitoserate in °/₀₀			
Alter des Spendertieres	2 Wochen		12 Monate	
Alter des Empfängertieres	2 Mon.	12 Mon.	2 Mon.	12 Mon.
Dosis 0,02 mg	13	2	0	0
« 0,10 mg	5	6	1	0
« 0,40 mg	3	2	0	2
« 3,00 mg	5	31	0	0
« 24,00 mg	10	9	0	2
« 188,00 mg	8	12	0	0

keit ist dagegen, wenn überhaupt, nur gering ausgeprägt, und zwar bei älteren Empfängertieren mehr als bei jungen. Bemerkenswert ist auch der Befund, daß eine Erhitzung der Leberaufschwemmung auf 60° C bzw. 100° C zum Verlust der mitoseerhöhenden Wirkung führt.

Ähnlich wie bei der Leber wurden Steigerungen der Mitoserate von Teir und Mitarbeitern auch in der Haut nach Injektion von Hautaufschwemmungen beobachtet. Ein gleichartiger Effekt wurde mit Gewebe der Tränendrüse und mit Magenschleimhaut erzielt.

Außer den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Teir liegen ähnliche Beobachtungen auch von anderen Untersuchern vor: Es ist bekannt, daß nach partieller Hepatektomie eine beträchtliche Erhöhung der Mitoserate in dem in situ belassenen Leberrest eintritt, die zur raschen Regeneration des Organs führt (u. a. Marshak und Walker 1945, Perkinson und Irving 1956). Durch Injektion von Serum solcher partiell hepatektomierter Ratten gelang es Freksa und Zaki (1954), bei normalen Ratten eine spezifische Erhöhung der Mitoserate in der Leber auf etwa das 40fache der normalen Zellteilungshäufigkeit herbeizuführen. Interessanterweise wurde dabei die Mitosezahl in der Gl. Parotis nicht beeinflußt, was für die Organspezifität des Wirkungsmechanismus spricht. Außerdem war

die Injektion des Rattenserums bei Mäusen unwirksam. Dies ist ein bemerkenswertes Argument zu Gunsten einer Artspezifität der Wirkung auf die Leber.

Nach GLINOS (1956) sind ähnliche Erhöhungen der Mitoserate durch Serum partiell hepatektomierter Tiere auch an Gewebekulturen von Leberzellen festgestellt worden. Von LOCKER und MOSER (1956) ist allerdings eine Erhöhung des O_2-Verbrauches von Leberschnitten in der Warburg-Apparatur auch nach Zusatz von Extrakt aus Lebern unbehandelter Ratten und auch nach Zusatz von Muskelextrakt beobachtet worden.

Anscheinend kann eine Erhöhung der Mitoserate auch durch einzelne Fraktionen des Lebergewebes herbeigeführt werden. So haben MARSHAK und WALKER (1945) gezeigt, daß die Injektion von Chromatin aus Zellsubstanz von Rattenleber die Teilungsrate der Leberzellen beim Empfängertier erhöht.

3. Der therapeutische Effekt von injiziertem Lebergewebe bei experimenteller Leberschädigung

Die ersten Untersuchungen, die systematisch auf die Frage nach dem Wirkungsnachweis der Zellulartherapie bei Lebererkrankungen gerichtet wurden, stammen von HARBERS (1954). Sie beruhen auf der Herbeiführung einer Leberschädigung bei Ratten durch Tetrachlorkohlenstoff und anschließender Injektion embryonaler Leberzellen. Zur Objektivierung des therapeutischen Effektes wurde die Absterberate in den Versuchs- und Kontrollgruppen miteinander verglichen. In vivo wurde die Schwere des Krankheitsbildes durch die Bromsulfaleinprobe kontrolliert.

Die von HARBERS mitgeteilten Befunde haben den therapeutischen Einfluß von Frisch- und Trockenzellen auf sehr schwere, durch Tetrachlorkohlenstoff herbeigeführte Leberschäden zum Gegenstand. Versuchstiere waren Wistar-Ratten. Den Tieren wurde 10–12 Wochen lang zweimal wöchentlich Tetrachlorkohlenstoff intraperitoneal injiziert (Dosis 0,625 ml/kg K.G.). Unter dieser Behandlung entwickelte sich ein Krankheitsbild, das zuerst zu Lebernekrosen führt und später dem Bild der Lebercirrhose sehr ähnlich wird. Das Leberparenchym wird zum großen Teil zerstört und die Struktur der Läppchen mit den Leberzellbalken aufgehoben. Später wird das Bindegewebe erheblich vermehrt, und es sind zahl-

reiche neugebildete Gallengänge zu erkennen. Als Folge der Stauung sind die Sinusoide der Leber oft beträchtlich erweitert.

Über den Ablauf der experimentellen Leberfibrose nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff unterrichten verschiedene Publikationen, von denen besonders die mikroskopischen Studien von ATERMAN (1954) erwähnenswert sind. Die biochemischen Veränderungen nach CCl_4-Vergiftung wurden von STOWELL und LEE (1951) als Steigerung des Glykogen- und Senkung des Fettstoffwechsels, Verminderung des Cholesterins und Erhöhung der Phosphatase- und Esteraseaktivität bei erhöhtem Wasser- und PNS-Gehalt in der Leber charakterisiert.

Um das Ausmaß der Leberschädigung vor Therapiebeginn und den eventuellen Heilungseffekt nach der Gewebeinjektion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren zu erfassen und zu objektivieren, ist von HARBERS der Bromsulfaleintest benutzt worden.
Diese besonders empfindliche und nach SNELL und MAGATH (1938) klinisch ungewöhnlich zuverlässige Leberfunktionsprobe ist bei Labortieren u. a. von AHMAD und FRAZER (1952) angewandt worden. Von HARBERS wurde das Untersuchungsverfahren in die Form einer Mikromethode gebracht.

Ein dem amerikanischen Bromsulfalein entsprechendes Präparat ist in Deutschland als «Bromthalein» (Merck) im Handel. Wird Bromthalein durch i. v. Injektion in den Kreislauf gebracht, so erfolgt die Ausscheidung dieser Verbindung nahezu selektiv über die Leber in die Galle. Bei Leberschäden erfolgen Resorption und Ausscheidung verzögert. Der Blutserumspiegel des Bromthalein fällt dann langsamer ab. Die Abgabe aus dem Blut erfolgt exponentiell mit einer Ausscheidungsrate von etwa 15% pro Minute beim gesunden Tier.
Bei der routinemäßigen Anwendung des Bromthaleintestes wird 15 Minuten nach Injektion Blut entnommen. Bei erheblicher Leberschädigung ist dann die Konzentration des Bromthaleins im Serum um ein Vielfaches höher als bei gesunden Tieren. Während sie beim gesunden Tier nur noch etwa 10% der Anfangskonzentration beträgt, kann sie bei schwerem Leberschaden noch 60% betragen. Die Injektion des Bromthaleins erfolgt bei Ratten i. v. in die Schenkelvene, die Blutentnahme durch Amputation eines Schwanzwirbels. - Gemeinsam mit NEUMANN wurden vergleichende Untersuchungen über die Beziehungen von Bromthaleinwerten und morphologisch faßbaren Leberschäden durchgeführt. Sie bestätigen, daß der Bromsulfaleintest ein guter Maßstab für das Ausmaß einer Beeinträchtigung der Leberfunktion ist.

Von HARBERS wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Gewöhnlich wurden aus Tieren, die 10 Wochen lang Tetrachlor-

kohlenstoff erhalten hatten, je drei Gruppen gebildet. 10 Tage nach der letzten CCl_4-Injektion wurde den Tieren einer Gruppe einmalig frisches Lebergewebe von embryonalen Ratten und der zweiten Gruppe gefriergetrocknete Leber injiziert (Dosis 17 mg). Die dritte Gruppe diente unbehandelt als Kontrolle.

Die Ergebnisse der Untersuchungen faßt HARBERS wie folgt zusammen: «Bei den Kontrolltieren zeigte die Erkrankung der Leber einen progredienten Verlauf mit immer höher werdenden Bromthaleinwerten. Die Tiere starben schließlich spontan oder aber in der für die Durchführung der Bromthaleinprobe erforderlichen Narkose (herabgesetzte Narkosebreite). Bei den mit Frisch- und Trockenzellen behandelten Tieren kam es dagegen zu einer beträchtlichen Senkung der Bromthaleinwerte, die als günstiger therapeutischer Effekt zu bewerten ist. Bezüglich der Wirkung von Frisch- und Trockenzellen ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede.»

In weiteren Versuchsreihen wurden Tieren nach Leberschädigung mit Tetrachlorkohlenstoff mehrfach hintereinander Trockenzellen injiziert. Auffällig war nach den Injektionen ein vorübergehender signifikanter Anstieg der Bromthaleinwerte, ehe es dann zu einem deutlichen therapeutischen Effekt kam. Eine gleichartig durchgeführte Versuchsreihe mit höherer Dosierung der Trockenzellen (jeweils 63 mg pro Injektion) zeigte praktisch den gleichen Verlauf.

Die Ergebnisse dieser Versuche wurden von HARBERS mit den Worten zusammengefaßt, «daß sowohl mit Frisch- als auch mit Trockenzellen die sehr schweren manifesten Leberschäden, die durch wiederholte Verabfolgung von Tetrachlorkohlenstoff gesetzt wurden, therapeutisch günstig beeinflußt werden. Ein Wirkungsunterschied zwischen Frisch- und Trockenzellen ließ sich nicht beobachten. Eine Erhöhung der Dosis der Trockenzellen wie auch eine sehr dichte Folge der Zellinjektionen führt offenbar zu keiner Wirkungssteigerung mehr, wenn eine Optimaldosis erreicht ist: bei den geschilderten Tierversuchen ist diese nicht größer als etwa 80 mg/kg K. G. anzunehmen. Eine Restitutio ad integrum ließ sich, wie bei der Schwere des Krankheitsbildes zu erwarten war, nicht erzielen.»

Es ist zu erwähnen, daß die gleichen Untersuchungsverfahren,

wie sie HARBERS benutzt hat, schon früher wiederholt zur Testung von Lebertherapeutika verwendet worden sind (vergleiche STILLE, 1953, STILLE und WACHTER 1953). Dabei wurden außer «Prohepar» verschiedene Purinkörper geprüft (Adenin, Xanthin, Hypoxanthin) und in ihrer therapeutischen Wirkung sehr verschieden gefunden.

Einige Jahre nach HARBERS haben HARDEGG und MAAS (1958) die therapeutische Wirkung von fetalen, homologen Lebergewebezellen nach Tetrachlorkohlenstoffschädigung an Ratten untersucht.

Weibliche Tiere erhielten 0,5 ml/kg Tetrachlorkohlenstoff dreimal wöchentlich zwei Monate lang i. p. injiziert. Es wurden die üblichen Veränderungen des Allgemeinverhaltens, Gewichtsabnahme und Ascitesbildung beobachtet. Als Maß für die Leberschädigung wurde die Aktivität der Serum-Cholinesterase bestimmt.

Im Laufe der CCl_4-Injektionen sank die Serum-Cholinesterase auf 30 bis 35% der ursprünglichen Aktivität ab. Nach Einsetzen der Therapie durch Injektion von fetalem Lebergewebe trat eine Erhöhung der Serum-Cholinesterase ein, die bei den mit Zellen behandelten Tieren ausgeprägter war als bei den Kontrolltieren. Allerdings wurde auch bei den Kontrolltieren ein leichter Anstieg der Cholinesterase festgestellt. Nach HARDEGG und MAAS «spricht manches dafür, daß die Lebertrockenzellen in der hier gezeigten Versuchsanordnung therapeutische Wirkungen besitzen». Eine ausreichende statistische Sicherung konnte jedoch infolge der großen Streuung der Einzelwerte nicht erreicht werden.

OETZMANN hat in zwei Veröffentlichungen (1958, 1959) über Tierexperimente zur Frage der therapeutischen Wirkung der Zellulartherapie nach experimenteller Leberschädigung berichtet. Statt Tetrachlorkohlenstoff wurde das von SCHWITZER für Tierversuche empfohlene Thioacetamid (TAA) appliziert. Die damit herbeigeführte Leberschädigung ist der Lebercirrhose vergleichbar.

Die Versuche von OETZMANN ergaben bei den mit Siccacell-Leber behandelten Ratten die höchste Überlebensrate (36,6%). Bei einer zu Vergleichszwecken mit Prohepar behandelten Tiergruppe betrug die Überlebensrate nur 13,3% und lag damit in der gleichen Höhe wie bei den unbehandelten Kontrolltieren. Auch die durchschnittliche Überlebensdauer war bei den mit Siccacell-Leber behandelten Tieren am höchsten (vergleiche Tabelle).

Tabelle 18

Zusammenfassung der Versuchsresultate von Oetzmann

	Lebensdauer	Überlebensrate
Kontrolltiere (ohne Therapie)	43 Tage	etwa 13%
Behandelt mit Siccacell-Leber	56 Tage	etwa 37%
Behandelt mit «Prohepar»	54 Tage	etwa 13%

Leider wurden über die interessanten Versuche von OETZMANN nicht alle Einzelheiten über Tierzahl, Dosierung und sonstige Versuchsbedingungen veröffentlicht. Dennoch sind auch seine Befunde gemeinsam mit den übrigen, übereinstimmenden Veröffentlichungen von Gewicht.

Abschließend sind noch die Tierversuche von LAUDAHN zu nennen, der nicht vollständiges Lebergewebe, sondern isolierte Mitochondrien der Leber injizierte. Die Leberschädigung wurde durch Tetrachlorkohlenstoff herbeigeführt. LAUDAHN berichtet, daß die CCl_4-Schädigung der Leber durch Injektion der mitochondrienreichen Gewebefraktion praktisch ausgeglichen werden konnte. Auch habe sich die nach länger fortgesetzter CCl_4-Schädigung der Leber eingetretene Aktivitätssenkung der alkalischen Phosphatase nach der Behandlung in kurzer Zeit wieder normalisiert. Es verdient großes Interesse, zu welchen Ergebnissen eine Nacharbeitung dieser bemerkenswert positiven Versuchsresultate führen wird.

Zusammenfassend führen die mitgeteilten Tierversuche zu dem Schluß, daß von allen Experimentatoren eine zwar entsprechend der Schwere der Krankheitszustände nur graduelle, aber doch übereinstimmend positive Beeinflussung der experimentell herbeigeführten Leberschädigungen durch Gewebeinjektionen beschrieben worden ist.

4. Prophylaktische Wirkung von injiziertem Lebergewebe

Versuche, durch prophylaktische Injektion von Lebergewebe eine höhere Widerstandsfähigkeit gegen später zugefügte Leberschädi-

gungen zu erreichen, sind bisher nur von RIETSCHEL (1958) durchgeführt worden. Als Versuchstiere dienten Gruppen von 40 bis 100 Ratten von 140 bis 160 g Gewicht. Den Tieren wurde fetale Leber intramuskulär injiziert. Die Dosis lag zwischen 10 und 40 mg Frischgewebe bzw. 1,5 bis 6 mg Trockengewebe pro Tier. Wechselnde Zeit danach wurde als Noxe Allylalkohol verabfolgt. Die Tiere erhielten zweiprozentigen, frisch verdünnten Allylalkohol mit Schlundsonde per os (dreiprozentiger Allylalkohol führt zu sehr schweren Leberschäden, 1,5prozentiger nur zu leichten Veränderungen). 24 Stunden später wurden die Ratten getötet und die als weiße oder hämorrhagische Nekroseherde imponierenden Schädigungsfelder nach mikroskopischer Projektion aufgezeichnet und zur Flächenbestimmung planimetriert.

Wenn keine therapeutischen Maßnahmen ergriffen werden, hat 14 Tage nach der Noxe eine völlige Regeneration der Leber stattgefunden. Würde zuerst die Schädigung der Leber erfolgen und erst dann die Gewebeinjektion, so könnte der nach klinischen Erfahrungen von RIETSCHEL erst etwa zwei Wochen danach eintretende therapeutische Effekt nicht mehr beobachtet werden. Aus dieser Erwägung heraus wurde das Lebergewebe bereits vor der Applikation des Allylalkohols injiziert.

Bei einer Versuchsreihe wurde der Allylalkohol 20 Tage nach der prophylaktischen Injektion des Lebergewebes verabfolgt. Die Tötung der Tiere erfolgte 24 Stunden danach. Bei der planimetrischen Auswertung wurde eine größere Ausdehnung der Nekrosefelder bei den mit Lebergewebe vorbehandelten Tieren gefunden (1606 cm^2 gegenüber 1023 cm^2). Als Durchschnitt von 50 Versuchstieren und 50 Kontrolltieren soll dieses Ergebnis signifikant sein. Bei einer zweiten Versuchsreihe hat RIETSCHEL jedoch genau umgekehrte Resultate gefunden. Auch dieses Resultat war mit einem p von 0,0032 noch signifikant. In einer dritten Versuchsreihe, bei der das Lebergewebe 40 Tage vor der Allylalkoholschädigung injiziert worden ist, waren die Nekrosefelder bei den vorbehandelten Tieren größer als bei den Kontrolltieren. Leider fehlen Einzelheiten, um die Ursache dieser uneinheitlichen Versuchsresultate erschließen zu können.

RIETSCHEL folgert mit Recht, daß eine prophylaktische Wirkung von Zellinjektionen zur Verhütung späterer akuter Leberschädi-

gung durch Allylalkohol nicht feststellbar ist. Es ist jedoch zu betonen, daß nach den Kenntnissen über den Wirkungsmechanismus der Zellulartherapie bei der von RIETSCHEL gewählten Versuchsanordnung ein positiver Effekt auch kaum zu erhoffen ist. Sinngemäß müßte man erwarten, durch prophylaktische Gabe von Calciumphosphat die Zahl der Knochenbrüche bei einem Eisenbahnunglück zu verringern. Die Zellulartherapie ist bisher zu keinem Zeitpunkt als Antidot für akute Vergiftungsschäden empfohlen worden, sondern gilt als eine die Regeneration begünstigende Therapie. Für eine solche Regeneration wurde hier aber gar keine Zeit gelassen. Statt die Ratten 24 Stunden nach Gabe des Lebergiftes (das heißt fast sofort nach dem «Unfall») zu töten, wäre es hochinteressant gewesen, das Ausmaß der Regeneration sechs oder acht Tage nach der Vergiftung zu untersuchen (bei unserem Bilde zu bleiben, die *Heilungstendenz* der Knochenbrüche abzuwarten). Aussichtsreicher wären die Versuche auch dann gewesen, wenn der ersten Gewebeinjektion eine leichte Leberschädigung vorausgegangen wäre, wie dies für Therapieversuche bei experimenteller Nierenschädigung empfohlen wurde (NEUMANN 1957). In diesem Fall hätte die Schwere des Krankheitsbildes nach der zweiten Allylalkoholgabe als Maß für die zwischenzeitliche Regeneration des durch die erste Noxe lädierten Lebergewebes gelten können.

5. Stichworte aus klinischen Untersuchungen

Aus klinischen Erfahrungen bei der Behandlung der Leberzirrhose mit Trockenzellen berichtet OETZMANN (1955), daß bei weit fortgeschrittenen, dekompensierten Cirrhosen der mit der Zellulartherapie einhergehende *Stress* das Krankheitsbild verschlechtern kann. Bei Patienten mit genügend funktionstüchtigem Lebergewebe wurde subjektiv eine Besserung bei objektiv oft unveränderten Befunden registriert. Auch KALK sah neben Besserungen auch Verschlechterungen des Krankheitszustandes. STEIN berichtet aus dem Krankengut von NIEHANS über gute Erfolge und vor allem über eine auffällig gute Ascitesausschwemmung. Allerdings injiziert NIEHANS den Patienten gewöhnlich auch noch Magenschleimhaut. Bei Tierexperimenten ist, abgesehen von Versuchen von RIETSCHEL, bisher immer nur Lebergewebe verwendet worden. Auf die auffällig rasch eintretende Resorption des bei Ratten nach Tetrachlor-

kohlenstoffapplikation auftretenden Ascites hat jedoch auch schon HARBERS ausdrücklich aufmerksam gemacht.

Es mag von Interesse sein, in zusammengefaßter Form auch die klinische Statistik von OETZMANN (1959) anzuführen, die durch den Vergleich verschiedener, klar voneinander abgegrenzter Therapieformen besticht.

OETZMANN unterscheidet in seinem Krankengut 3 Gruppen:

Gruppe a Der Patient wurde lediglich mit der Basistherapie: Cholin, Hepsan, Vitaminen und Diät behandelt.

Gruppe b Behandlung erfolgte mit Cholin, Hepsan, Diät und Prednison.

Gruppe c Behandlung mit Cholin, Hepsan, Diät sowie Gewebeinjektionen, und zwar in allen Fällen Leber, Nebenniere und Placenta. Zu dieser Gruppe gehörten 210 Patienten.

Die Ergebnisse der klinischen Nachuntersuchungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

Tabelle 19

Zusammenfassung der klinischen Erfolgsstatistik von Oetzmann. Erklärung der mit a, b und c bezeichneten Therapieform im Text. n = Zahl der Patienten. Die in Klammern gesetzten Ziffern geben die Resultate der etwa zwei Jahre später erfolgten Nachuntersuchungen wieder

Krankheitsbild	Therapieform	n	gebessert	unverändert	verschl.
Chronische Hepatitis	a	116	57 %	39 %	4 %
	b	54	50 %	9 %	41 %
	c	99	67 %	33 %	0 %
	(c)	(62)	(18 %)	(47 %)	(35 %)
Übergangsstadien	a	45	39 %	39 %	22 %
	b	19	42 %	16 %	42 %
	c	38	65 %	29 %	6 %
	(c)	(22)	(23 %)	(41 %)	(36 %)
Kompensierte Cirrhosen	a	54	33 %	45 %	22 %
	b	27	37 %	45 %	18 %
	c	63	48 %	43 %	9 %
	(c)	(51)	(21 %)	(28 %)	(51 %)
Dekompensierte Cirrhosen	a	–	–	–	–
	b	22	14 %	14 %	72 %
	c	12	0 %	50 %	50 %
	(c)	(5)	(0 %)	–	(100 %)

Die guten Erfolge mit der Therapieform c (Basistherapie plus Gewebeinjektionen) fallen ins Auge. OETZMANN erwähnt, daß nach der Gewebetherapie vor allem bei den chronischen Hepatitiden und den Übergangsstadien das Allgemeinbefinden für eine Zeit von 6 bis 14 Monaten besser war. «Man hat den Eindruck, als ob ein Reservoir aufgefüllt war, aber nur auf Zeit.»

6. Zusammenfassung

Die vorn beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen über eine therapeutische Wirksamkeit der Injektion von Lebergewebe sind auf zwei Versuchsformen zurückzuführen:

a) Noxe → Therapieversuch → Bestimmung der Heilungstendenz

b) prophylaktische Zellinjektion → Leberschädigung → Bestimmung der Schwere der Leberschädigung.

Die Versuche, welche nach dem Schema a) angelegt wurden, haben fast übereinstimmend zu positiven Aussagen geführt. Daß eine Restitutio ad integrum nur in einigen Fällen erfolgt ist, kann bei der Art des Krankheitsbildes, das einer Lebercirrhose entspricht, kaum anders erwartet werden.

Die Versuche, welche nach dem Schema b) durchgeführt wurden, haben keine Hinweise auf eine prophylaktische Wirkung der Zellinjektionen erbracht. Nach den grundsätzlichen Voraussetzungen für die Anlage tierexperimenteller Prüfungen der Zellulartherapie war dies vorauszusehen, da eine von sich aus optimale Organfunktion durch Gewebeinjektionen nach unserem heutigen Wissen nicht weiter verbessert werden kann. Tierversuche nach folgendem mehr Erfolg versprechenden Schema:

c) leichte Organschädigung → Gewebeinjektion → Wartezeit → schwere Organschädigung → Bestimmung der Absterberate bzw. der Schwere des Krankheitsbildes

wurden bisher nicht durchgeführt.

Es mag erlaubt sein, an dieser Stelle auf die besonderen Gesichtspunkte und die ungewöhnlich schwierigen Bedingungen bei der tierexperimentellen Prüfung der Zellulartherapie hinzuweisen, die selbst dem erfahrenen Tierexperimentator zahlreiche Probleme bieten. Es ist kaum daran zu zweifeln, daß stets ein Teil der tierexperi-

mentellen Versuchsreihen auf diesem Gebiet zu negativen Resultaten führen wird, weil die zur Objektivierung einer Wirkung erforderlichen Bedingungen im Tierversuch bei bestem Willen nicht in allen Fällen zu erreichen sind.

Das hauptsächliche Problem bietet die Erzeugung gleichmäßig schwerer und chronisch verlaufender Krankheitsbilder, das heißt von Formen der Leberschädigung, die nicht in wenigen Wochen spontan remittieren und auch eine erst nach längerer Zeit einsetzende therapeutische Wirkung erkennen lassen. Aber auch eine völlig irreversible Form der Leberschädigung ist für solche Versuche ungeeignet. Es spricht alles dafür, daß zum Beispiel bei der Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff der Erfolg des Therapieversuches weitgehend davon abhängt, ob für die Beendigung der CCl_4-Applikation der richtige Zeitpunkt abgepaßt wird, zu welchem die Leberschädigung weder irreversibel zum Tode führt noch spontan remittiert.

Somit sind weitere Untersuchungsarbeiten über die beste Art und Weise der Leberschädigung besonders wichtig. Es mag sein, daß die Anregung von SCHMIDT (1958), zur Schädigung der Leber Extrakte vom Knollenblätterpilz (Amanita phalloides) zu verwenden, sich als wertvoll erweist. Schließlich darf nicht vergessen werden, daß bei den bisherigen Tierversuchen stets nur Lebergewebe appliziert worden ist und nicht, wie meist beim Menschen, gleichzeitig Placenta und manchmal auch Nebenniere. Alles in allem stellt jedoch das Studium der Zellulartherapie an Tieren mit experimentell herbeigeführter Leberschädigung ohne Zweifel ein hochinteressantes und aussichtsreiches Feld für eine weitere Bearbeitung dar.

Die Beeinflussung der Angiopathien der experimentellen Gefäßsklerose durch Placenta-Zellen

VON DR. S. DORNBUSCH, FRANKFURT

Der auffallend günstige Einfluß der Zellulartherapie, insbesondere der von Placenta-Zellen, auf Angiopathien und die arteriosklerotische Symptomatik ließ den Gedanken aufkommen, daß ein spezifischer antiarteriosklerotischer Effekt vorliegen könne. Diesem Effekt ist die Grundlagenforschung bereits von dem allgemeineren Standpunkt der Revitalisierung, beziehungsweise von dem der biologischen Verjüngung aus, nachgegangen. Da das Altern des Organismus jedoch nicht unbedingt dem Grad der Gefäßveränderungen parallel zu gehen braucht, bedarf die Beeinflußbarkeit der arteriosklerotischen Angiopathien einer besonderen Untersuchung.

Derartige Untersuchungen werden erschwert, da bei der Arteriosklerose eine komplexe, durchaus noch nicht vollständig erkennbare und definierte Ätiopathogenese vorliegt.

Die Grundlagenforschung steht daher nicht nur vor den Schwierigkeiten der klinischen Prüfung, sondern auch vor der Schwierigkeit nachzuweisen, wodurch und wie die Injektionen von Placenta-Zellen die Arteriosklerose beeinflussen.

Aus der Klinik sind meßbar bessere periphere und coronare Durchblutungsverhältnisse sowie Verbesserungen der allgemeinen und speziell der geistigen Leistungsfähigkeit bekannt (KLEINSORGE 1956, KUHN und KNÜCHEL 1956, OETZMANN 1956, STEPANTSCHITZ und SCHREINER 1956). Um über den bis jetzt noch sehr unklaren, möglicherweise im Zellstoffwechsel liegenden Revitalisierungseffekt als Erklärung hinauszukommen, war es notwendig, die eventuelle Beeinflußbarkeit der einzelnen bekannten ätiologischen Arteriosklerosefaktoren zu untersuchen.

Dem Fettstoffwechsel kommt bei der Arterioskleroseentstehung auf Grund klinischer und experimenteller Ergebnisse eine nicht unwesentliche Bedeutung zu. Auch im Rahmen der Zellulartherapie wurde von KUHN und KNÜCHEL eine Parallelität zwischen klini-

scher Besserung von degenerativen Myocarderkrankungen sowie Gefäßsklerosen und günstiger Beeinflussung vorhandener Dyslipoproteinämien durch Placenta-Zellinjektionen beobachtet. Da sich außerdem für diesen ätiopathogenetischen Faktor der Arteriosklerose, wenn auch nur unvollkommen, tierexperimentelle Modellversuche anbieten, lag es nahe, zu prüfen, beziehungsweise auszuschließen, ob der zellulartherapeutische Effekt über einen Angriffspunkt im Fettstoffwechsel tatsächlich die arteriosklerotischen Gefäßprozesse betrifft.

Die Schwierigkeiten, die hinsichtlich der Beurteilung der Ergebnisse und erst recht hinsichtlich ihrer Einordnung und Erklärung bestehen, zeigen sich eindeutig an den zu verschiedenen Zeiten, von verschiedenen Untersuchern vorgelegten, unterschiedlichen Befunden. So fanden zum Beispiel Kuhn und Knüchel ebenso wie Kleinsorge und Dornbusch eine Senkung erhöhter Cholesterinwerte, während Oetzmann eine eindeutige Erhöhung nach Placenta-Zellinjektionen feststellte.

Von den ersten tierexperimentellen Untersuchungen sind überhaupt nur die histologischen und pathologisch-anatomischen Ergebnisse verwertbar, da die ohnehin mit großen Fehlerbreiten belasteten Cholesterinbestimmungen methodisch zu wenig exakt waren.

Mit der in den letzten Jahren erst aufgekommenen Aktivierung der Arterioskleroseforschung wurde ferner erkennbar, daß auch der Modus der Cholesterinverfütterung bei der artifiziellen Cholesterinatheromatose von wesentlicher Bedeutung für deren Entwicklung und ihre bedingte Vergleichbarkeit mit der menschlichen Arteriosklerose ist. Ebenso sind die in früheren Versuchen tierexperimentell verabreichten Placenta-Zellinjektionen quantitativ den beim Menschen verwandten Dosen zu inadäquat, um auch nur einen angenäherten Vergleich zuzulassen. Eine reine Stresswirkung, allein durch die zu große Injektionsmenge verursacht, läßt sich dabei nicht ausschließen.

Immerhin zeigt sich auch bei diesen Versuchen eine eindeutige Beeinflußbarkeit artifizieller Atheromatosen durch Placenta-Zellinjektionen.

Einen wirklichen Wert für die Grundlagenforschung haben auf Grund der Exaktheit der Versuchsbedingungen und hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit mit anderen Ergebnissen der Arteriosklerose-

forschung erst die späteren Untersuchungen von WIETEK und TAUPITZ sowie KLEINSORGE und DORNBUSCH.

WIETEK und TAUPITZ hielten 36 weibliche, gleichaltrige Inzuchtratten unter gleichen konstanten Versuchsbedingungen und verabreichten über einen Zeitraum von 80 Tagen eine reines Cholesterin enthaltende Sklerosediät nach HOOGERWERF, modifiziert durch Beigabe von hydriertem Fett. Nach Einteilung der Tiere in drei Gruppen von je zwölf wurde folgendermaßen verfahren:

Die Tiere der Gruppe VI erhielten ab fünfter Woche nach Fütterungsbeginn jeden zweiten Tag 0,2 cm^3 einer Aufschwemmung von lyophilisierten Placenta-Zellen (1 Originalampulle Schafplacenta in 5 cm^3 Tyrodelösung) intramuskulär injiziert. Den Tieren der Gruppe VII wurden in zweitägigen Abständen 0,5 cm^3 der Placentasuspension mittels Schlundsonde zugeführt. Die Tiere der dritten Gruppe «Ko» liefen zur Kontrolle lediglich unter Verfütterung der Sklerosediät.

Während der Versuchsdauer fanden Blutentnahmen durch Herzpunktionen für die Bestimmung des Cholesteringehaltes, der Eiweißfraktionen und des Lipoidphosphors sowohl einen Tag vor Fütterungsbeginn als auch bei Tötung der Tiere statt. Mittels Blutentnahme aus der Schwanzvene in vierzehntägigem Abstand wurde das rote und weiße Blutbild kontrolliert. Gewichtskontrollen erfolgten in fünftägigen Abständen. Nach Tötung der Tiere in Äthernarkose wurde vor der Sektion von der linken Herzkammer aus bei eröffneten Jugularvenen mit 0,9prozentiger Kochsalzlösung durchspült. Die Organe Leber, Nebenniere, Niere, Herz, Lunge und Aorta von je sechs Tieren wurden bis auf einen zur histologischen Untersuchung verwandten Teil verascht und einer quantitativen Cholesterinbestimmung unterzogen.

Aus den Aschefiltraten von Niere und Aorta wurde darüberhinaus noch titrimetrisch nach Fällung mit Oxalat der Calciumgehalt bestimmt. Die Cholesterinbestimmung erfolgte nach SCHÖNHEIMER und SPERRY, die Lipoidphosphorbestimmung nach FISKE und SUBBAROW, modifiziert nach KRAINIK, die elektrophoretische Auswertung der Serumproteide nach ANTWEILER.

Bei allen Tieren der Kontrollgruppe konnte eine fortgeschrittene Gefäßsklerose festgestellt werden, die die Autoren der menschlichen Arteriosklerose ähnlich fanden. Ferner zeigten alle Tiere eine erheb-

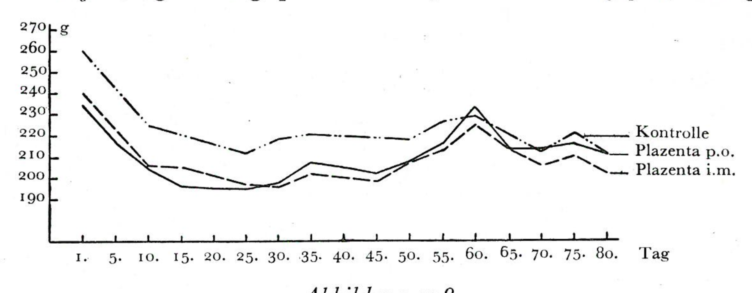


Abbildung 118
Körpergewicht in g während der Versuchszeit

liche Reduktion des Körpergewichtes, Abnahme bis Schwund allen Depotfettes, eine Leukocytose und Erythropenie. Im Serum war eine Senkung des Cholesteringehaltes, besonders des Estercholesterins, bei Zunahme des freien Cholesterins sowie eine geringe Abnahme der Beta-Globuline und deutliche Zunahme der Gamma-Globuline charakteristisch. Die Organanalysen ergaben eine Zunahme des Cholesteringehaltes der Leber, der Nebenniere und der Lunge. Das Frischgewicht der Aorten war auf das Doppelte angestiegen. Histologisch zeigten sich schwerste Verkalkungen der Niere, der Aorta, der Herzkranzgefäße und der Lungenarterien.

Während bei der Versuchsgruppe, die die Placentasuspension oral verabreicht erhielt, keine nennenswerten Abweichungen gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet wurden, zeigten die intramuskulär behandelten Tiere doch beachtenswerte Befunde. Nach einem anfänglichen Schwund des Körpergewichtes trat eine schnellere Erholung ein, und die mesenterialen Fettdepots waren besser erhalten (Abbildung 118). Gesamtcholesterin und Phospholipoide nahmen zu und überstiegen die Anfangswerte, wobei die Gesamtcholesterinerhöhung durch Zunahme des freien Cholesterins zustande kam. Die Estercholesterine dagegen zeigten eine abnehmende Tendenz (Tabelle 20). Für eine eindeutig günstige Beeinflussung der arteriosklerotischen Gefäßprozesse sprechen das niedrige Frischgewicht der Aorten, der signifikant niedrigere Calciumgehalt sowohl in den Aorten als auch in den Nieren, die histologischen und die Sektionsbefunde (Tabelle 21).

So wurden bei 50% der oral und unbehandelten Tiere Verkalkungen in den abführenden Harnkanälchen, im Interstitium des Markes und in besonders schweren Fällen auch Verkalkungen der

Tabelle 20

Serumwerte am Anfang und Ende des Versuches

	Eiw. %	Alb. rel. %	α_1 Glob. rel. %	α_2 Glob. rel. %	β_1 Glob. rel. %	β_2 Glob. rel. %	γ Glob. rel. %	Ges. Chol. mg %	Ester mg %	freies Chol. mg %	Ph. Lip. mg %
Ø vorher	6,6	37	14	7	5	19	18	78	59	19	72
V_1 nachher	7,0	36	13	6	5	20	20	89*)	58	31	100*)
V_2 nachher	7,0	35	15	6	4	18	22	72	51	21	47
Ko nachher	6,5	34	14	5	5	18	24	71	46	25	52

*) = Werte ließen sich gegenüber den Ausgangswerten und den Daten der Gruppe V_2 und Ko an Hand der Berechnung der signifikanten Differenz nach der Formel: $\frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon^2_1 + \varepsilon^2_2}} = > 2$ statistisch sichern.

Tabelle 21

Calcium-Gehalt von Niere und Aorta in % des Frischgewichtes und absoluter Calcium-Gehalt der Aorta in mg von je 6 Tieren

	Niere %	Aorta %	Aorta mg
⌀ n	0,046	0,039	0,169
V_1	0,078*)	0,785*)	6,021*)
V_2	0,151	1,946	18,68
Ko	0,125	1,788	19,17

*) = Werte ließen sich gegenüber den Daten der Gruppen V_2 und Ko statistisch sichern

Glomeruli mit arteriosklerotischer Narbenbildung in der Rinde gefunden. Dagegen boten die intramuskulär behandelten Tiere lediglich geringgradige Verkalkungen im Bereich der abführenden Harnkanälchen. In gleicher Weise waren bei einer Einteilung der Aortenveränderungen in drei Schweregrade bei dieser Gruppe keine Veränderungen der Stufe drei zu erkennen. Entsprechend geringere Veränderungen zeigten auch die untersuchten Präparate von Herz und Lunge, so daß WIETEK und TAUPITZ abschließend argumentieren: «Durch die intramuskuläre Injektion von Placenta-Sicca-



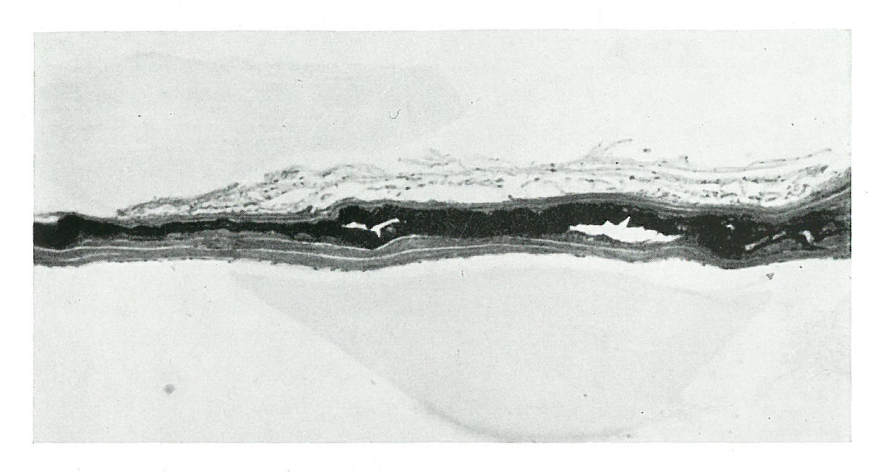


Abbildung 119
Ausschnitt aus der Aorta eines Ko-Tieres (Kossa / Kernechtrot, Maßstab 53:1). Massive Mediaverkalkung.



Abbildung 120
Ausschnitt aus der Aorta eines V_1-Tieres (Kossa / Kernechtrot, Phasenkontraste, Maßstab 200:1). Primäre Intimaverdickung.

cellen läßt sich die experimentelle Sklerose der Ratte zumindest weitgehend verzögern.»[1]

Eine eindeutige Hemmung der Gefäßveränderungen bei der alimentären Cholesterinatheromatose der Kaninchen beobachteten auch KLEINSORGE und DORNBUSCH. Sie führten ihre Versuche an 60 ausgewachsenen gleichaltrigen weiblichen und männlichen Kaninchen durch. Die Versuchsdauer betrug 120 Tage. Die Placenta-Siccacellinjektionen erfolgten in regelmäßigen Zeitabständen (am 1., 15., 30., 45., 60., 75. und 90. Tag) und waren dem Körpergewicht der Tiere (40 mg/kg Körpergewicht einer Originalaufschwemmung von Placenta-Siccacell) angepaßt. Auch die täglich oral verabreichte Cholesterinmenge wurde mit 0,25 g/kg Körpergewicht individuell dosiert. Laufende Blutbildkontrollen zeigten bei der Kontrollgruppe, das heißt bei 25 Tieren, die nur Cholesterin ohne Placenta-Siccacellinjektionen erhielten, ebenfalls eine erhebliche Erythropenie und Leukocytose. Bei den Placentatieren wurde in gleicher Weise eine starke Leukocytose, aber ein unverändertes rotes Blutbild gefunden. Auffällig war bei diesen Tieren eine erhebliche Eosinophilie, wie sie auch von WIETEK und TAUPITZ beobachtet wurde.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen von DORNBUSCH ließ sich bei dieser Versuchsreihe ein konstant senkender Effekt auf den Cholesterinspiegel nicht nachweisen. Die Diskrepanz wird mit der unterschiedlichen Methode der Cholesterinbestimmung und der differierenden Versuchsanordnung erklärt. Die Cholesterinbestimmung bei den hier angeführten Untersuchungen wurden wie bei WIETEK und TAUPITZ nach SCHÖNHEIMER und SPERRY vorgenommen. Die Serumcholesterin- und Phospholipoidwerte unterlagen während der Versuchsdauer erheblichen Schwankungen, die bei den Placentatieren im Zusammenhang mit den Injektionen über die normale Streuungsbreite hinausgingen.

Pathologisch-anatomisch zeigte sich bei den unbehandelten Tieren eine wesentlich stärkere Atheromentwicklung als bei den mit Placenta-Siccacell behandelten. Zur Bewertung der arteriosklerotischen Gefäßveränderungen wurde eine von KATZ und STAMMLER angegebene Einteilung zwischen 0–5 herangezogen. Danach erhält eine

[1] Abbildungen 118 bis 120 und Tabellen 20 und 21 aus: WIETEK, H. und TAUPITZ, E.: Arzneim.-Forsch. 7, 479–485 (1957).

glatte, makroskopisch atheromfreie Intimafläche die Bewertung 0, während bei Grad 5 große, konfluierende Plaques auf der gesamten Intimaoberfläche vorhanden sein müssen. Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der Versuchsanordnung. Der hemmende Einfluß der Placenta-Siccacellinjektionen auf die Atheromentwicklung konnte in diesen Versuchen durch die dreifache Varianzanalyse gegenüber der Kontrolltierserie mit 99 % Wahrscheinlichkeit gesichert werden.

Um einen möglichen prophylaktischen Wert der Placenta bei der artifiziellen Atheromatose festzustellen, wurde bei einer Gruppe von zehn Tieren jeweils 30 und 15 Tage vor der Cholesterinbelastung eine Placenta-Siccacellinjektion verabreicht. Der Anstieg des Gesamtcholesterins im Serum war bei diesen Tieren in den ersten 20 Tagen wesentlich träger. Der weitere Versuchsverlauf unterschied sich nicht von dem der nicht prophylaktisch behandelten Placentatiere.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei den bis jetzt durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen zur Frage der Arteriosklerosebeeinflussung durch Placenta-Zellinjektionen ein spezifisch senkender Effekt auf erhöhte Lipoprotein- und Cholesterinwerte nicht nachgewiesen werden konnte. Der hemmende Einfluß auf die atheromatösen Gefäßprozesse ist daher nicht auf einen, eventuell intermediär erfolgenden Ab- oder Umbau des alimentär zugeführten Cholesterins zurückzuführen. Wie weit unter dem stimulierenden Einfluß der Placenta-Zellinjektionen hormonelle, nervale oder Stoffwechselfunktionen gesteigert oder normalisiert werden, konnte nach den bisher sich nur auf die Beobachtung von bestimmten Serumfaktoren und Gefäßwandprozessen beschränkenden Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Wachstumsimpulse heterologer Gewebe in der Gewebekultur

VON PROF. DR. MED. F. SCHMID, HEIDELBERG[1]

Die Konfrontation von heterologen Geweben innerhalb eines lebenden Organismus führt zu komplexen immunologischen Vorgängen. Welches Schicksal dabei das Spendergewebe erleidet und welche Maßnahmen der Empfängerorganismus in Gang setzt, ist an anderer Stelle dargestellt. Die hier vorliegende Serie von Gewebekulturuntersuchungen sollte eine einfache Fragestellung beantworten helfen: Üben heterologe Gewebezusätze bei ausgeschalteter Immunreaktion einen Einfluß auf das Wachstum von Gewebekulturen aus? Untersuchungsobjekt waren Ratten-Knochenmarkgewebekulturen, welchen 18 verschiedene heterologe Gewebesuspensionen vom Schaf oder vom Kalb in der Nährlösung zugesetzt wurden.

Mit einer derartigen Versuchsanordnung ist am sichersten eine Aussage darüber möglich, ob eine Substanz eine biologische Wirkung ausübt oder nicht. In der Gewebekultur sind psychische Faktoren und regulative Komponenten von Seiten eines lebenden Organismus nicht vorhanden. Die Milieufaktoren können weitgehend konstant gehalten werden, die inneren Wachstumspotenzen sind bei gleichem Versuchsmaterial und annähernd gleicher Größe der Gewebepartikel gleichzusetzen. Freilich muß berücksichtigt werden, daß lebende Zellen in einer Gewebekultur unter unphysiologischen Bedingungen stehen. Rückschlüsse auf das Verhalten eines Empfängerorganismus sind nur mit Einschränkungen möglich. Hier interessierte aber in erster Linie die Frage, ob in einem biologischen Experiment durch heterologe Gewebezusätze ein Wachstumsimpuls zu erzielen ist oder möglicherweise sogar eine Wachstumshemmung eintritt.

Kriterien für die Wachstumsintensität der Gewebekulturen waren in der vorliegenden Serie die Dichte und Ausdehnung der *Emigrationszonen*. Zur Verwendung kam Rattenknochenmark. Die zuge-

[1] Die experimentellen Untersuchungen wurden zusammen mit Dr. Hildegard Lewald, Hamburg, durchgeführt.

setzten heterologen Gewebearten sind aus der Tabelle 22 zu entnehmen. Neben der Beurteilung der Emigrationszone wurden verschiedentlich Ausstrichpräparate der emigrierten Zellen hergestellt, um einen Einblick in Form und Struktur dieser Zellen zu gewinnen.

Methodisches Vorgehen

Die Knochenmarkpartikel wurden aus Femur und Tibia frisch getöteter Tiere gewonnen. Die Züchtung erfolgte in Deckglaskulturen im hängenden Tropfen. Das Nährmedium bestand aus gleichen Teilen Hühnerembryonalextrakt, Hühnerplasma und Biotest. In jeder Versuchsserie liefen Kontrollkulturen. Während die Kontrollkulturen zusätzlich mit je einem Tropfen Tyrodelösung beschickt waren, wurde den Kulturen der Versuchsserie je ein Tropfen einer Zellsuspension zugeführt. Die Zellsuspensionen entstammten lyophylisierten, wiederaufgelösten Trockengeweben. Die Kulturen wurden nach 48stündiger Bebrütung im Brutschrank bei 37° C einmal mikroskopisch betrachtet, nach 96 Stunden ausgewertet. Die Emigrationszonen wurden mit dem Radius des Explantates in Relation gebracht, die Dichte der Emigrationszonen im Mikroskop nach einem Punktsystem bewertet. Insgesamt sind 162 Gewebekulturen ausgewertet, davon 32 Kontrollkulturen.

Ergebnisse

Knochenmarkexplantate ohne Gewebezusätze (Kontrollkulturen)

Bevor eine Aussage über den Einfluß auf Gewebekulturen möglich war, mußten 32 Kulturen ohne Zusätze ausgewertet werden. Ein Rückgriff auf entsprechende Angaben im Schrifttum war nicht möglich, da diese Angaben zu sehr differieren. Die wertvollsten Erkenntnisse stammen von H. Rasmussen, wurden aber an Knochenmarkkulturen von Kaninchen gewonnen. Ähnlich wie bei dessen Versuchen erkennt man am 4. Tage nach der Explantation eine Unterteilung der Emigrationszone in einen dichteren inneren und einen lockeren äußeren Ring. Dieser formale Unterschied beruht vorwiegend auf der Ansammlung verschiedener Zellformen in den einzelnen Zonen. Vom Saum des Explantates strahlen radiär die *Fibroblasten* aus, welche sich wie Eiszapfen mit zunehmender Entfernung verdünnen (Abbildung 121). Zwischen den Fibroblasten fin-

den sich größere, vielgestaltige, als *Polyblasten* bezeichnete Zellen, während die lockere Peripherie der Emigrationszone von *kleineren Zellelementen* beherrscht wird.

Je besser die Ernährungsbedingungen sind, um so weiter und um so dichter pflegt die Emigrationszone zu sein. Ein weiteres Merkmal der Güte des Nährmediums ist die Verteilung der Zellformen. Je besser die Ernährungsbedingungen sind, um so reichlicher erscheinen relativ gut ausdifferenzierte Rundzellen. Bei schlechten Ernährungsbedingungen dagegen und mit zunehmender Erschöpfung der Nährlösung treten primitive Bindegewebszellen in den Vordergrund. Das Schicksal einer Gewebekultur ist auf lange Sicht im Sinne einer Entdifferenzierung bereits festgelegt, diese kann man allerdings durch Wechsel des Nährmediums über lange Zeit, theoretisch sogar unbegrenzt, hinausschieben. Schon CARREL soll durch Gewebezusätze die Lebensdauer der Kulturen jeweils verlängert haben.

In unseren eigenen Kontrollkulturen ohne Gewebezusätze fanden wir am 4. Tag nach Explantation mäßig weite und mäßig dichte Emigrationszonen, die teilweise schon recht intensiv von Fibroblasten durchsetzt waren. Im Durchschnitt betrug die Tiefe der Auswanderungszone das 1,6fache vom Radius des Explantates. Die Fibroblastenbildung stellte sich als ein besonders guter Indikator für die Wirksamkeit des Nährmediums dar.

Knochenmarkkulturen mit Trockengewebezusätzen

Dichte und Ausdehnung der Emigrationszone

Unter den geprüften 18 Geweben konnte zunächst sehr deutlich eine abgestufte Beeinflussung der Emigrationszone erkannt werden. Die überwiegende Mehrzahl der Gewebepräparate rief eine Erweiterung der Auswanderungszone hervor. Neben dieser Flächenzunahme ergab sich auch eine reich differenzierte Veränderung der Zelldichte. Die Ergebnisse sind im einzelnen aus der Tabelle 22 und den Abbildungen 122 bis 127 zu entnehmen.

Nimmt man die Durchschnittswerte der Kontrollkulturen in Nährlösung als Vergleichsgrundlage, so sind mit einzelnen Geweben erhebliche Wachstumsimpulse festzustellen. Der Index aus Ausdehnung und Dichte der Emigrationszonen lag zum Beispiel bei

Tabelle 22

Versuchsserie	Ausdehnung	Zelldichte	Wachstums-quotient	Prozentuale Wachstums-steigerung bzw. Wachstums-minderung
Kontrollen	1,6	2,2	3,8	0
Blut	2,0	2,8	4,8	+26 %
Knochenmark	2,1	1,6	3,7	— 2,0 %
Lymphknoten	2,0	2,6	4,6	+21 %
Milz	2,2	2,4	4,6	+21 %
Thymus	2,5	2,3	4,8	+26 %
Niere	2,2	2,7	4,9	+29 %
Leber	2,5	3,0	5,5	+45 %
Großhirnrinde	1,9	2,7	4,6	+21 %
Großhirnmark	2,0	2,5	4,5	+18 %
Zwischenhirn	2,2	2,6	4,8	+26 %
Hypothalamus	2,7	3,6	6,3	+66 %
Mittelhirn	2,2	2,0	4,2	+10 %
Haut	1,9	2,0	3,9	+ 2,6 %
Hoden	1,2	2,0	3,2	—13 %
Placenta	2,7	2,6	5,3	+40 %
Omentum maius	2,0	2,7	4,7	+24 %
Bindegewebe	1,9	2,1	4,0	+ 5,3 %
Knorpel	2,2	3,0	5,2	+37 %

Hypothalamus 66 % über den Kontrollwerten. Diesen absoluten Spitzenwerten folgt eine Gruppe um 40 % Wachstumssteigerung (Leber 45 %, Placenta 40 %, Knorpel 37 %). Das Gros der Gewebe, vor allem die lymphoreticulären und Gehirngewebe ließen eine Wachstumssteigerung um 20–30 % erkennen. Überraschend war der fehlende, eher negative Einfluß von fetalem Knochenmark (–2 %); die inaktiven, osteoiden Splitter bilden eher ein mechanisches Hindernis und lösen sich kaum auf. Die wachstumshemmende Wirkung von Hoden (–13 %) konnte theoretisch nicht geklärt werden.

Das Zellbild der Emigrationszonen

scheint nicht nur von den allgemeinen Lebensbedingungen der Kultur, sondern auch von der Art der Gewebezusätze abhängig zu sein. Fetale Milz, Lymphknoten und Knochenmark scheinen das Fibro-

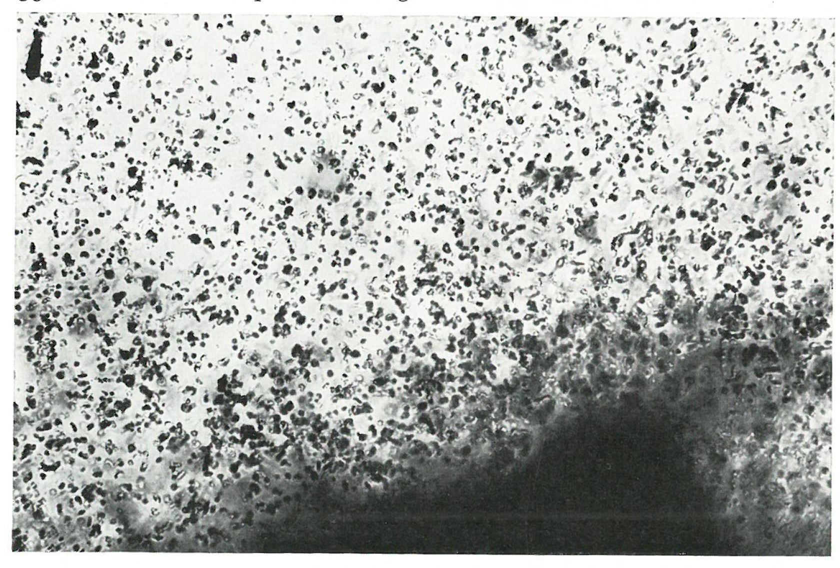


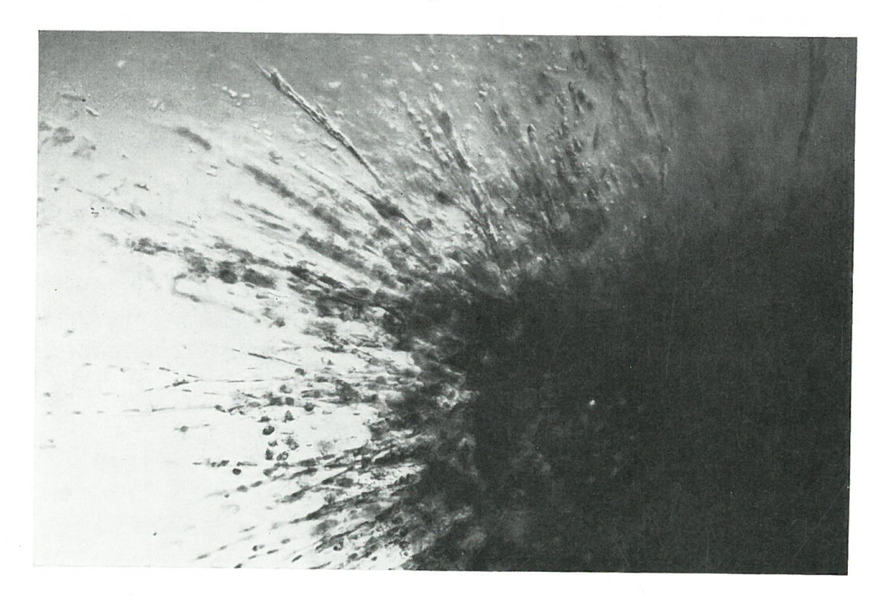
Abbildung 121 a und b

Rattenknochenmarkexplantate in Nährlösung nach 96 Stunden.

a) unter günstigen Wachstumsbedingungen lockere, mäßig weite Emigrationszone,

b) eine strahlenkranzförmige Fibroblastenwucherung deutet auf ungünstige Wachstumsbedingungen hin.

Kontrollpräparate, Explantatausschnitt jeweils dunkel.



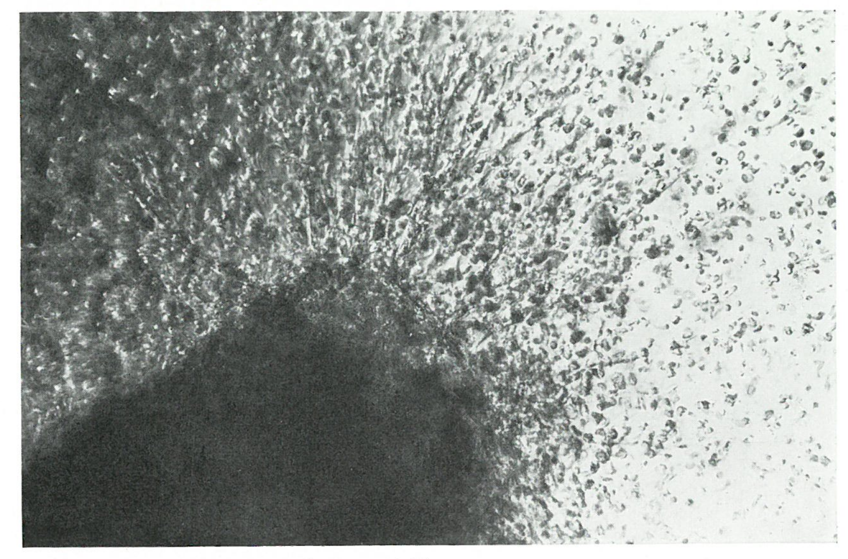


Abbildung 122
Knochenmarkexplantat in Nährlösung unter Zusatz von lyophilisiertem, heterologem Großhirngewebe. Relativ dichtere, reichlich von Fibroblasten durchsetzte, relativ schmale Emigrationszone.

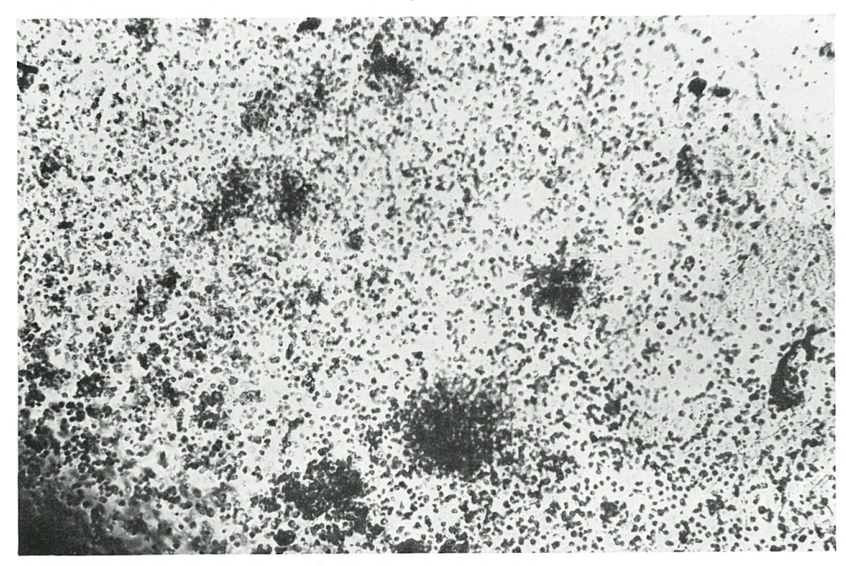


Abbildung 123
Knochenmarkexplantat in Nährlösung unter Zusatz von lyophilisiertem, heterologem fetalem Knorpel. Weite Emigrationszone, die emigrierten Zellen sammeln sich in dichten Säumen um die größeren Knorpelpartikel.

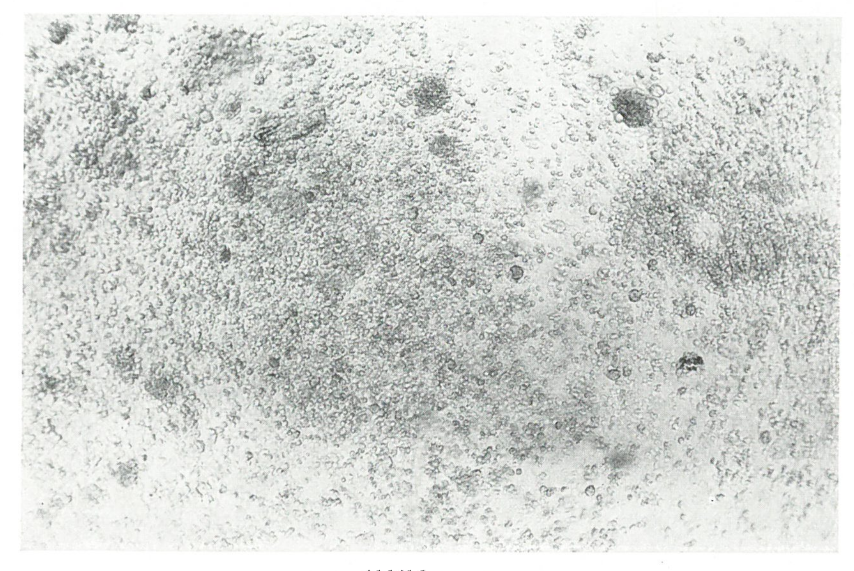


Abbildung 124
Weite sehr dichte Emigrationszone (aus auffallend hellen Zellen) nach Zusatz von (juvenilem) Hypothalamusgewebe.

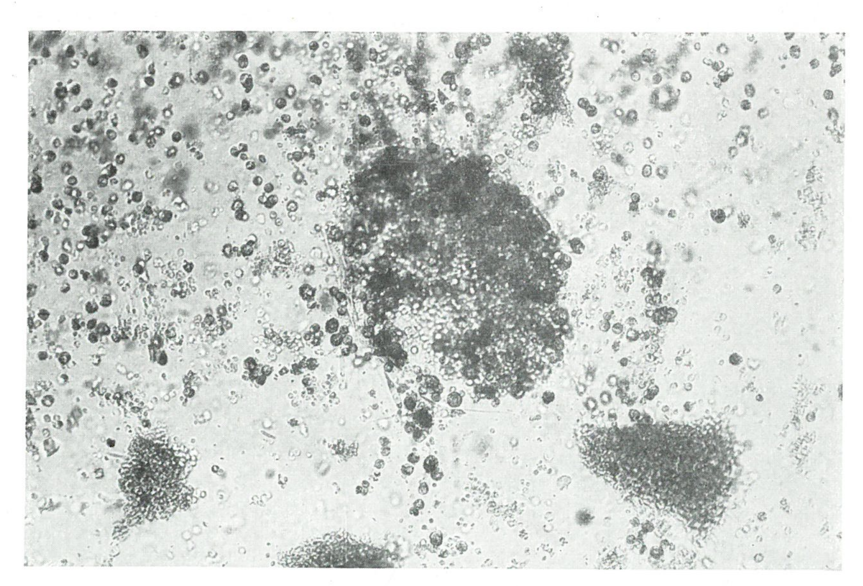


Abbildung 125
Ansammlung von Zellen der Emigrationszone um ein Milzpartikelchen.

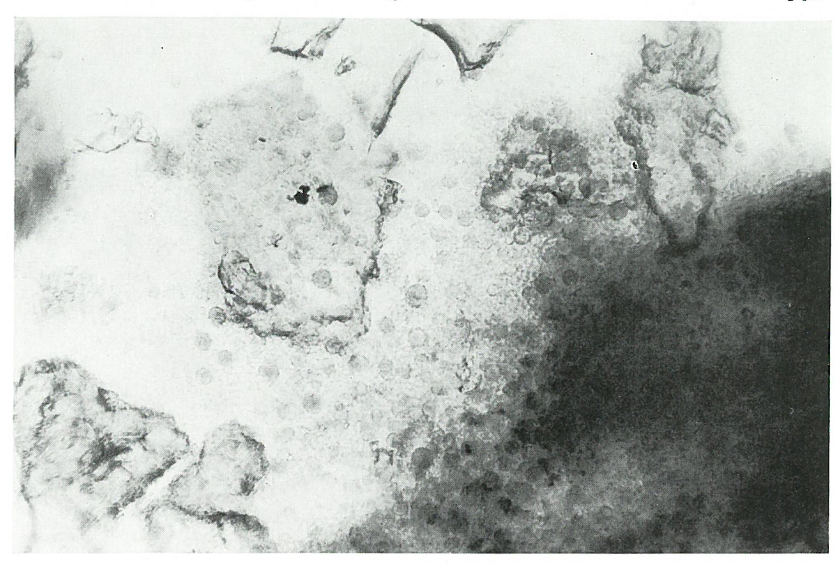


Abbildung 126
Wenige, aber sehr große Emigrationszellen nach Zusatz von fetalem, gefriergetrocknetem, heterologem Knochenmark *(noch inaktiv)*.

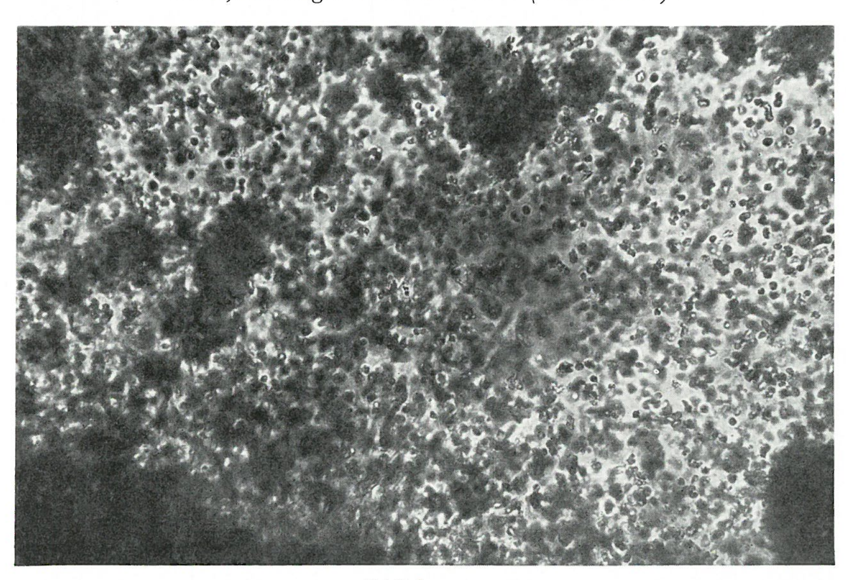


Abbildung 127
Weite, dichte und mehrschichtige Emigrationszone nach Zusatz von fetaler, heterologer Niere. *Explantatpartikel homogen dunkel.*

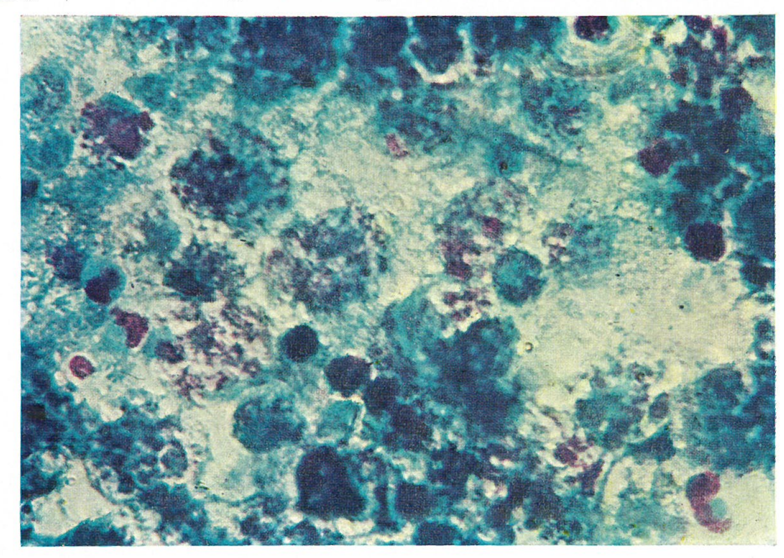


Abbildung 128
Die Zellen der Emigrationszone weisen bei annähernd unauffälliger äußerer Form Strukturanomalien im Cytoplasma und im Kern auf.

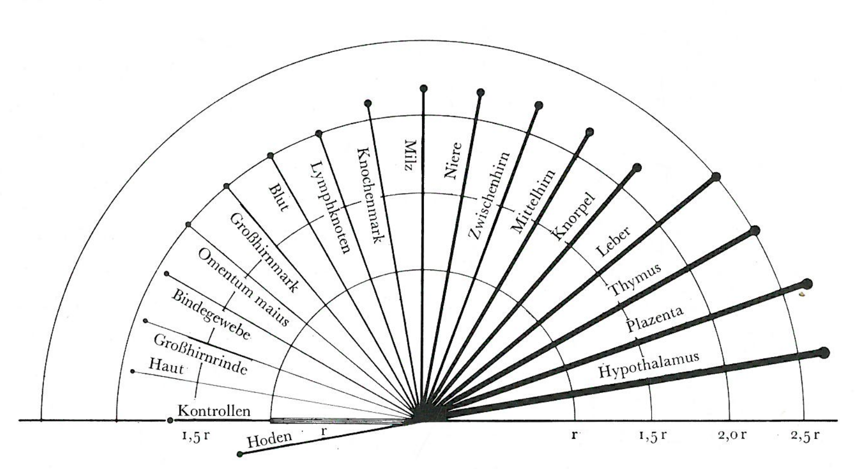


Abbildung 129
Ausdehnung der Emigrationszonen *bei Rattenknochenmark nach Zusatz verschiedener fetaler und postfetaler, heterologer, lyophilisierter Gewebe im Vergleich zu den Kontrollen.*

blastenwachstum leicht anzuregen, stärker wird die Fibroblastenwucherung von Großhirnrindensubstanz (Abbildung 122) gefördert. «Hemmend» auf die Fibroblastenbildung wirkten sich Knorpel, Hypothalamus, Thymus, Placenta und Omentum maius aus. Die gleichen Gewebe rufen dichte Emigrationszonen aus kleinen Rundzellen hervor (Abbildung 123, 124). Bindegewebe und Knochenmark veranlassen die Bildung einer spärlichen Zahl großer blasiger Zellen.

In mehreren Präparaten wurde versucht, die Emigrationszellen näher zu untersuchen, die Färbungen gelangen nicht immer zufriedenstellend. Diese Beobachtung fand ihre Erklärung in den Form- und Struktureffekten der emigrierten Zellen (Abbildung 128). Sowohl das Cytoplasma als auch der Kern zeigen grobe Strukturabweichungen von Knochenmark- und Blutzellen, speziell Defekte. Die äußere Form der Zellen ist grob gewahrt. Cytochemische Analysen würden hier vermutlich weitere Aufschlüsse bringen, welche Substanzen (oder Zellorganellen) in den Emigrationszellen fehlen.

Die heterologen Gewebe

sind in kleinen Partikeln oder einzelnen Zellen im Emigrationsfeld nachweisbar; sie sind devitalisiert, vermehren sich nach Resuspension nicht. Ihre Morphologie ist erhalten, wenn auch gegenüber vitalen Präparaten alteriert. Die anfangs scharfen Strukturen und Konturen verschwimmen im Laufe von vier Tagen, an den Rändern der Gewebepartikel kommt es zu Quellungserscheinungen.

Um die heterologen Gewebepartikel sammeln sich die Emigrationszellen, wie um «Futterkrippen»; man erkennt dichte «Zellstraßen», die vom Explantat zu größeren Geweberesten führen. Diese Affinität von Kultur- und heterologen Trockenzellen war besonders deutlich bei Knorpel, Thymus, Blut und Placenta. Verschiedentlich waren in der Umgebung der Fremdgewebe auch größere Zellen (Polyblasten) nachzuweisen als im übrigen Emigrationsfeld. Andere Zusätze wie Hypothalamus oder Milz ließen zellfreie Höfe um größere Gewebepartikel erkennen, welche allerdings immer erst nach 96 Stunden – nicht vorher – gefunden wurden.

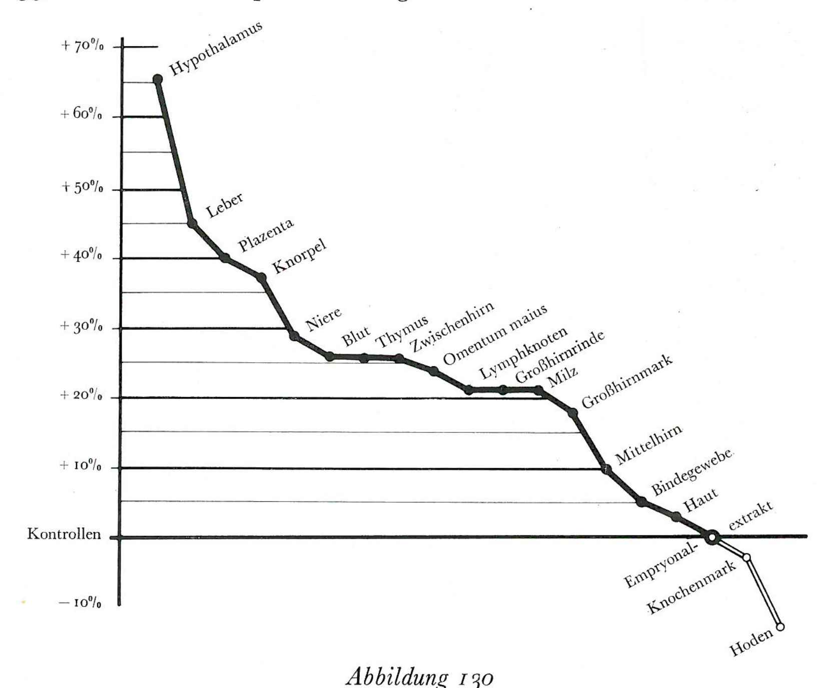


Abbildung 130

Wachstumsindices *aus Dichte und Ausdehnung der Emigrationszonen an Ratten-Knochenmarkexplantaten nach Zusatz verschiedener heterologer Gewebe im Vergleich zu den Kontrollen.*

Zusammenfassung

Gewebekulturen von Rattenknochenmark dienten als Modell, um den Einfluß heterologer, vorwiegend fetaler Gewebe auf das Wachstum der Gewebekultur bei fehlender immunologischer Abwehr zu untersuchen. 18 verschiedene Gewebe ließen unterschiedliche Einflüsse auf Ausdehnung, Dichte und Zellbild der Emigrationszonen erkennen. Die Mehrzahl der Gewebe führte zu einem deutlichen Wachstumsimpuls, aber auch Hemmungen wurden registriert. Die Art des Gewebezusatzes hat einen Einfluß auf die vorherrschende Zellmorphe. Viele Anhaltspunkte sprechen dafür, daß die heterologen Gewebepartikel im Nährmedium aufgelöst und als zusätzliche Nährstoffquelle selektiv ausgewertet werden. Eine ausführliche Wiedergabe der Versuchsanordnung und Ergebnisse findet sich bei F. Schmid und H. Lewald.

Der Einfluß von Zellpräparaten auf Wachstum und Körpergewicht im Tierversuch

VON PROF. DR. F. DITTMAR, HÖXTER

Als Domäne der Zellulartherapie gelten heute alle degenerativen und entzündlichen Prozesse, bei denen je nach ihren physiologischen Gegebenheiten und je nach Maß des noch verbliebenen funktionstüchtigen Gewebes eine Restitution erwartet werden darf. Unter Restitution müssen hier solche Stoffwechselvorgänge verstanden werden, die durch Mitosen und unter Wahrung des Formprinzipes zur Neubildung von funktionstüchtigem, organspezifischem Gewebe führen. Mit großer Wahrscheinlichkeit werden dabei Substanzen von Vitamin- oder Fermentcharakter wirksam, die den sogenannten Wuchsstoffen sehr nahe verwandt oder mit ihnen identisch sind. Nach v. MURALT findet bei der Nervenregeneration eine vermehrte Synthese von Nucleoproteiden durch den Nucleolus statt, die – wie auch einige exogene Aminosäuren – ebenfalls als «Wirkstoffe» (v. BERTALANFFY), beziehungsweise als Energiedonatoren gelten müssen.

RIETSCHEL macht darauf aufmerksam, daß man neben der «Regeneration im anatomischen Sinne» eine Regeneration «im erweiterten Sinne» anerkennen müsse, die durch «allgemeine Reaktionen, wie Wachstum der einzelnen Zellen, Zunahme des Stoffwechsels und der Atmung, Vermehrung der Interzellularsubstanz» charakterisiert sei. Er versteht hier unter Regeneration eine «Anfachung der Lebensvorgänge, eine Vitalisierung» des Gesamtorganismus, und bezeichnet diese unspezifischen Stoffwechseleffekte als die Hauptwirkung der Zellulartherapie. RIETSCHEL übernimmt den von NIEHANS geprägten Begriff der Revitalisierung zur Charakterisierung von Energieumsätzen, die auf einer Aktivierung des Zellstoffwechsels beruhen und die immer den Gesamtorganismus betreffen. Wenn auch der Revitalisierungseffekt in bestimmten pathologischen Situationen nachteilig sein dürfte, so muß er im Rahmen der Zellulartherapie doch als der «eigentliche therapeutische Heilfaktor» (RIETSCHEL) gelten.

Ohne Zweifel liegen hier zuverlässige experimentelle Beobachtungen vor, die durch die klinische Erfahrung bestätigt werden. Die Revitalisierung äußert sich beim Patienten in einer Hebung des subjektiven Befindens, in einer Steigerung der geistigen und körperlichen Reserven, in einer Zunahme der aktiven Hautdurchblutung und des Hautturgors und in einer Gewichtszunahme ohne Fettansatz.

In diesem Zusammenhang sei auch an die alten experimentellen Befunde von HOLTFRETER erinnert, der das induzierte Wachstum von implantierten Gewebekeimen durch eine Behandlung des Versuchstieres mit frischen und älteren unspezifischen Zellbreien (aus Muskulatur und Haut) wesentlich beschleunigen konnte. Die Untersuchungen von HOLTFRETER haben uns ermutigt, die Frage aufzuwerfen, ob auch das Wachstum junger Tiere durch eine Behandlung mit Frischzellen beeinflußt werden kann. Es gilt die Tatsache, daß die Grundprinzipien des Stoffwechsels bei allen Lebewesen die gleichen sind, als ein wichtiges Ergebnis der neueren Stoffwechselforschung. Und in der Tat beantwortet der Wachstumstest beim Menschen wie beim Tier mit der gleichen Zuverlässigkeit die Frage, ob der Organismus eine gegebene Substanz aufbaut, beziehungsweise in genügender Menge aufbaut oder nicht. Die Resultate unserer Versuche sind signifikant genug, um sie zur Diskussion zu stellen.

Jungen Mäusen im Alter von 2–3 Wochen und mit Ausgangsgewichten zwischen 13,5 und 15,5 g wurde zweimal pro Woche je 0,5 cm³ einer Frischzellenaufschwemmung (1 Teil Zellmaterial zu 2 Teilen physiologische Kochsalzlösung) intraperitoneal injiziert.

Die Ernährung der drei Versuchsreihen von je 30 Mäusen und der Kontrollserie der nichtinjizierten Tiere wurde konstant gehalten. Sie entsprach der Altromin R-Standarddiät für Mäuse.

In unseren Versuchen stellten wir fest, daß die wachstumsfördernde Wirkung der Zellaufschwemmungen nicht abnimmt, wenn zwischen Entnahme und Injektion ein zeitlich begrenztes Intervall liegt. Da wir sogar eine gewisse Zunahme der stimulierenden Wirkung beobachteten, kann vermutet werden, daß im vorliegenden Falle eine Enzymwirkung mitspielte. Es ist bekannt, daß die Fermentwirkung, zum Beispiel des Pankreas, gesteigert werden kann, wenn man das Organ einer abakteriellen Autolyse unterzieht. Durch

die Autolyse werden vorher zellgebundene Desmofermente frei, deren Wirkung sich zu derjenigen der bereits in Lösung befindlichen Lyofermente addiert. In unserem Versuch sind deutliche Abweichungen der Kurven im Sinne eines beschleunigten Wachstums der Tiere dann zu bemerken, wenn inveterierte, sterile Zellaufschwemmungen zur Injektion benutzt wurden (siehe Abbildung 131, Reihe I am 29. Tag, Reihe II am 11. und 30. Tag, Reihe III am 27., 37. und 49. Tag).

In diesem Zusammenhang soll auch die Tatsache erwähnt werden, daß inveterierte, sterile Zellaufschwemmungen (bei intraperitonealer Injektion von 0,5 cm^3) von Versuchstieren vertragen wurden, wenn durch steriles Vorgehen eine bakterielle Entwicklung der biogenen Amine, der Leichengifte, vermieden wurde.

Noch einige Worte zur Technik der Präparatgewinnung: Das steril entnommene Organ wurde, entgegen der originalen Vorschrift von NIEHANS, nicht mit dem Messer zerkleinert, sondern – abgewogen und mit der doppelten Gewichtsmenge von physiologischer Kochsalzlösung versetzt – im Multimix verarbeitet. Die mikroskopische Untersuchung der fertigen Zellaufschwemmung ergab, daß im Herzmuskelpräparat noch Zellstrukturen nachweisbar waren. Die Aufschwemmungen von Thymus und von Hühnerembryo zeigten hingegen ein homogenes Medium. Auch hier werden wir wieder auf die Tatsache hingewiesen, daß die Wirkung der Zellpräparate nicht unbedingt von der Existenz intakter Zellen abhängig ist, sondern daß es sich um den experimentellen Effekt von Wirkstoffen handelt, die aus ihrer Zellhaftung erst befreit werden müssen, um wirksam zu werden. Bei der therapeutischen Anwendung der Frischzellen vollzieht sich dieser Vorgang natürlicherweise während der Resorption des intramuskulär injizierten Zelldepots. Wir haben es bei der Zellulartherapie also vielleicht nicht mit Ganzzellreaktionen, beziehungsweise mit der Wanderung intakter Ganzzellen zum kranken Organ zu tun, sondern wahrscheinlich mit der Wirkung von Zellbausteinen und Zellinhaltsstoffen.

Zur Technik der intraperitonealen Injektion der Zellaufschwemmungen: Sie ist denkbar einfach, da man wegen der Homogenität der Präparate feinkalibrige Kanülen benutzen kann. Sekundäre Infektionen werden auf diese Weise leichter vermieden als bei der Verwendung dicker Nadeln, die für handzerkleinerte Zellpräparate un-



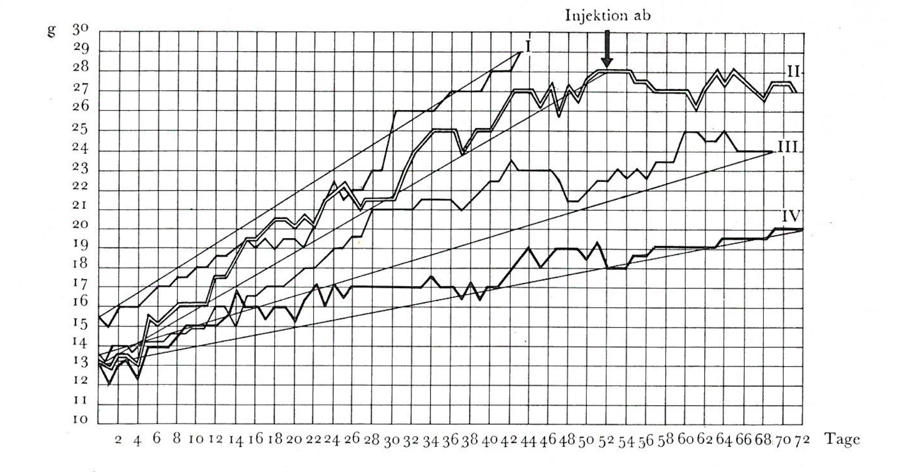


Abbildung 131
Wachstumskurven junger Mäuse nach intraperitonealen Injektionen von Zellpräparaten.

erläßlich wären. Trotz der zahlreichen Wiederholungen der Injektionen werden zwar gelegentlich geringfügige und nur eine Viertelstunde andauernde Eiweißschockzustände mit Freß- und Bewegungsunlust beobachtet, nie aber typische allergische Reaktionen – mit einer Ausnahme: wenn zusammen mit dem 10 Tage alten Hühnerembryo gleichzeitig sein Dottersack verarbeitet und injiziert wurde, traten bei wiederholter Injektion schwere allergische Reaktionen auf, die sich in hochgradiger motorischer Unruhe, in heftigem Pruritus, Sträuben des Felles und Lichtscheu äußerten. Die Tiere kratzten sich selbst und gegenseitig bis zum Abklingen der allergischen Reaktionen (nach etwa einer halben Stunde) teilweise blutig. Zuweilen traten auch Lidödeme auf. Diese Reaktionen blieben aber vollständig aus, wenn der Embryo vor seiner Verarbeitung vom Dottersack abgetrennt und durch Übergießen mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurde. Diese auffallende Beobachtung sei erwähnt auch im Hinblick auf die Tatsache, daß die weiße Maus für Allergieversuche sonst ungeeignet ist. Im allgemeinen zeigt sie nur nach einer sehr umständlichen und langwierigen speziellen Vorbehandlung eine Allergiebereitschaft.

Besprechung der Befunde: Die Kurve der nichtinjizierten Kontrolltiere verläuft im ganzen konstant (siehe Kurve IV). Die durchschnittliche Gewichtszunahme beträgt in 72 Tagen 7 g.

Der Verlauf der Kurve I (Injektion von Thymus) ist von dem der Kurve IV stark abweichend. Die durchschnittliche Gewichtszunahme beträgt in der kurzen Versuchszeit von 43 Tagen bereits 13,5 g. Dieses Ergebnis überrascht jedoch nicht, da es sich hier offenbar um eine zusätzliche spezifische Hormonwirkung handelt. Die Funktion des Thymus als «Wachstumsdrüse» ist bekannt. Der wachstumsanregende Wirkstoffeffekt wird in dieser Reihe also von dem spezifischen Hormoneffekt übertönt.

Auch die Kurve III weist eine signifikante Divergenz zur Kurve IV auf. Durch die Injektion von Herzmuskulatur wird während 69 Tagen eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 10,5 g erzielt. Interessant ist hier die Tatsache, daß die Herzmuskelpräparate nicht nur von jugendlichen, sondern auch von älteren Tieren entnommen werden konnten. Die Präparate waren auch bei Entnahme von älteren (ca. 1 Jahr alten) Tieren gleich wirksam. Mit anderen Worten: Auch das erwachsene Tier produziert wachstumsfördernde Wirkstoffe – in Analogie zu der zeitlebens vorhandenen Befähigung zur Regeneration von Gewebedefekten.

Den auffallendsten Verlauf nimmt die Kurve II, die den Gewichtsanstieg der mit Hühnerembryo injizierten Mäuse zeigt. Die durchschnittliche Gewichtszunahme beträgt während 52 Tagen 15 g, also das Dreifache der Kontrollkurve IV, die während 52 Tagen nur um 5 g ansteigt. Am 52. Tage wurde die Injektionsbehandlung abgesetzt, da zu diesem Zeitpunkt alle bebrüteten Eier unbefruchtet waren. Hier ist der Kurvenbefund sehr bemerkenswert: der bisherige rapide Gewichtsanstieg bricht plötzlich ab, die Gewichtskurve verläuft jetzt waagerecht.

Es bedarf der besonderen Erwähnung, daß die schnell an Gewicht zunehmenden Tiere größenmäßig nicht zurückblieben. Größe und Gewicht korrespondierten also miteinander. Bei der nachträglichen Sektion waren keine anomalen Fettanlagerungen nachweisbar. Auch das Aussehen der injizierten Tiere, besonders der mit Hühnerembryo behandelten, war im Vergleich zur Kontrollgruppe besonders gut. Die Tiere waren trotz der zahlreichen Injektionen munter, gesund und von glatter Haarbeschaffenheit. Als besonders lebhaft

und sogar aggressiv erwiesen sich die mit Thymus injizierten Mäuse; der Lauftrommelversuch zeigte bei ihnen jedoch ein schnelleres Nachlassen der Kräfte als bei den anderen Versuchsgruppen.

Zusammenfassung

1. Durch intraperitoneale Injektionen von Zellaufschwemmungen aus Kalbs-Thymus, Hühner-Embryo und Rinder-Herzmuskulatur gelingt es, eine stetige harmonische Wachstumsbeschleunigung bei jungen Mäusen zu erzielen. Am wirksamsten erweist sich das Zellpräparat aus Hühnerembryo.

2. Zur Anregung der Wachstumsbeschleunigung ist die ausschließliche Anwendung von Zellaufschwemmungen aus fetalen oder Jungtierorganen nicht erforderlich. Es zeigt sich, daß auch Organpräparate von älteren Tieren wirksam sein können. Hier besteht eine Parallele zu der allgemein bekannten Tatsache, daß Wundregenerationen in jedem Lebensalter stattfinden.

3. Die Anwendung von frischen Zellaufschwemmungen ergab in den vorliegenden Versuchen keinen Vorteil vor der Anwendung inveterierter, autolytischer Zellpräparate. Es wird jedoch widerraten, aus diesen experimentellen Beobachtungen Nutzanwendungen für die Zellulartherapie zu ziehen.

4. Die Wirkung der Zellpräparate auf das Wachstum junger Mäuse beruht nicht auf einer spezifischen Leistung der intakten Zelle. Vielmehr muß es sich dabei um den Effekt von Wirkstoffen oder Bausteine der Zelle handeln.

5. Die Zerstörung der Zellstrukturen in den Zellpräparaten (durch mechanische Maßnahmen und durch Autolyse) war bei diesen Versuchen Voraussetzung für das Wirksamwerden der in den Zellen enthaltenen fermentativen Wirkstoffe.

6. Eine Eiweißwirkung im Sinne der Reizkörpertherapie darf nicht angenommen werden, da die verwendeten hohen Eiweißdosen dabei ohne Zweifel zur Kachexie, nicht aber zur Gewichtsvermehrung geführt haben würden. In der Zellulartherapie ist das Phänomen der unspezifischen Reizkörperwirkung des Eiweißes während der ersten 10 Tage nach der Injektion bekannt. Es muß jedoch nicht als therapeutischer Erfolg, sondern als unvermeidliche Begleiterscheinung gewertet werden.

7. Eine spezifische Hormonwirkung kann für die Hühnerembryo- und Herzmuskelpräparate nach ihren anatomischen Voraussetzungen als unwahrscheinlich gelten.

8. In den beschriebenen Versuchen traten allergische Reaktionen nur bei gleichzeitiger Verarbeitung des Dottersackes vom Hühnerembryo in Erscheinung. Die Injektionen von Thymus, von Hühnerembryo ohne Dottersack und von Herzmuskulatur führten nicht zu allergischen Reaktionen.

Revitalisierung



Die tierexperimentelle Objektivierung des Revitalisierungseffektes nach Zellinjektionen

VON PROF. DR. A. KMENT, WIEN

I. Einleitung

Bis ins Altertum zurück reicht die Geschichte der Übertragung von Zellen oder Geweben vom Tier auf den Menschen oder vom Menschen selbst wieder auf den Menschen. Diese Berichte enthalten Namen wie Hippokrates, Plinius d. Ä., Paracelsus und Angaben über chinesische Ärzte, die Zell- beziehungsweise Gewebeübertragungen teils als Therapieform zur Bekämpfung der damaligen «Hauskrankheiten» empfahlen, teils aber schon erkannten, daß auf diesem Weg die Möglichkeit einer biologischen Stimulierung bestand, das heißt die Möglichkeit, einen müden, funktionsgeschwächten oder alternden Organismus wenigstens für einige Zeit wieder zu aktivieren, zu revitalisieren. Der Wunsch des Menschen, sich dem oft allzu raschen Alterungsprozeß entgegenstellen zu können, durchzieht alle Zeitepochen bis in unsere Tage.

Unter Vitalität wird allgemein die Lebenskraft, die naturhafte Lebendigkeit oder auch die zu erwartende Lebensdauer (HERDER, 1956) verstanden. Andere (SCHMIDT, 1934) umschreiben sie als die größere oder geringere Kraft der Lebensfunktionen. Der Genetiker (KÜHN, 1956; MÜNTZING, 1958) wieder sieht in der Vitalität allgemein mehr die Lebenseignung. Die Vitalgefühle oder Vitalempfindungen (HERDER, 1956) sind die von den Organtätigkeiten ausgelösten Organempfindungen. Dazu gehört das Gemeingefühl als Totalgefühl des sinnlichen Wohl- oder Übelbefindens.

NIEHANS hat den Begriff «Revitalisierung» im Zusammenhang mit der von ihm begründeten Zellulartherapie in die Medizin eingeführt; der Revitalisierungseffekt ist beim größten Teil der zellbehandelten Patienten festzustellen. RIETSCHEL (1957) schreibt darüber: «Der wesentliche Erfolg der Zellulartherapie bezieht sich auf eine Besserung des Allgemeinzustandes. Wenn wir die verschiedenen Krankheitsgruppen durchgehen, so fällt immer wieder auf, daß

ein ganz erheblicher Hundertsatz der Patienten von einer allgemeinen Besserung, von einer größeren Leistungsfähigkeit, also von einer subjektiven Besserung des Allgemeinbefindens spricht. Dieses Phänomen stellt sich nicht als irgendeine Leistungssteigerung eines einzelnen Organs dar, sondern trifft immer den ganzen Organismus. Die Revitalisierung äußert sich in einer Steigerung des Appetits, bei untergewichtigen Personen in einer Gewichtszunahme, in einer besseren Durchblutung der Haut, in einem Verschwinden der Hautrunzeln und -falten, in einer Besserung der geistigen und körperlichen Leistungsfähigkeit, in einer gesteigerten Stimmungslage, schlechthin in einer Zunahme der Vitalität. Hier überschneiden sich auch Körperliches und Psychisches in auffallender Weise und sind nicht mehr trennbar.» Nach dem gleichen Autor beruht der Revitalisierungseffekt wahrscheinlich vorwiegend auf Stoffwechselveränderungen, «die eine funktionelle Regeneration herbeiführen, also die Funktion eines geschädigten Organs zu bessern vermögen».

Es darf nicht übersehen werden, daß jedes Lebensgeschehen, sei es gesund oder krank, an Zellen, Geweben, Organen und Organismen abläuft, die, einzeln und gesamt, der Entwicklung, der Abnutzung und dem Alterungsprozeß unterliegen. Das elementare Grundaxiom der Physik, der Satz von der Entropie, gilt auch für die naturwissenschaftlich-medizinische Forschung. BÜRGERS Lehre von Altern und Krankheit als Problem der Biomorphose (1960) beinhaltet und beleuchtet das ganze Problem. KÖHLER (1961) weist darauf hin, daß «BÜRGER mit Recht jenen prinzipiellen schicksalhaften Ablauf, beispielsweise im Bereiche der für das Alter des menschlichen Organismus so besonders wichtigen Blutstrombahn, vor allem der Arterien, als Physiosklerose dem pathologischen Geschehen der Arteriosklerose gegenüberstellt». BÜRGERS Lehre «spiegelt nur das allgemeine kosmische Prinzip der Vergänglichkeit und damit des Alterns der materiellen Struktur für den Sonderfall menschlicher Metamorphose wider». Und es ist KÖHLER (1961) nur beizustimmen, wenn es heißt: «Wie eingangs schon angedeutet, lassen sich die Begriffe Altern und Abnutzung nicht trennen. Vielmehr ist es nicht nur möglich, sondern wissenschaftlich sogar höchst zweckmäßig, die Phänomene des Alterns unter dem Blickpunkt der Abnützung zu sehen und zu verstehen. Diese Sicht hat uns gegenwärtig schon Möglichkeiten in die Hand gegeben, mit denen wir

Ausmaß und Tempo des Verschleißes im Prinzip ebenso zu steuern vermögen wie bei unseren technischen Maschinen.» In der Zellulartherapie nach NIEHANS liegt eine dieser Möglichkeiten, und der Revitalisierungseffekt ist deren Ausdruck. Diese Frage wissenschaftlich zu untersuchen, war das treibende Moment der nachstehenden Tierexperimente; sie sollten klären helfen, ob eine Objektivierung des «Revitalisierungseffektes» möglich ist.

II.

a) Methoden und Tiermaterial

Nachdem es sich bei dem Revitalisierungseffekt im Rahmen der NIEHANSschen Zellulartherapie um ein komplexes biologisch-medizinisches Geschehen handelt, sollten zu den Versuchen einer tierexperimentellen Objektivierung verschiedene Untersuchungsmethoden verwendet werden. Ausgegangen wurde vom Verhalten des Laboratoriumstieres im Labyrinth, dem sich Aktivitätsstudien anschlossen. Die Untersuchungen über die Elastizität und Rißfestigkeit der Haut sowie über die Elastizität der Aorta waren geplant, um eventuell meßbare Aufschlüsse über den Zustand von Organen und Geweben nach der Zellbehandlung zu erhalten. Dem gleichen Zweck waren die Untersuchungen des Kollagens und der J^{131}-Aufnahme der Schilddrüse gewidmet. Eine Vertiefung erfuhren schließlich die tierexperimentellen Untersuchungen durch das Studium der Gewebeatmung und der Mitochondrien, da die Frage interessant war, ob auch in diesem biologisch-physiologischen Bereich allenfalls eine Auswirkung der Zellinjektion zu beobachten ist.

Ausgehend von den in der Einleitung dargelegten Gedankengängen über den engen Zusammenhang von Abnutzung und Alterungsprozeß und deren Beziehung zu einer Reihe von Krankheiten im höheren Lebensalter, wurden Untersuchungen über den Einfluß des Alterns auf den tierischen Organismus, einzelne Organe, Gewebe und Funktionen durchgeführt, um allenfalls die Ergebnisse als Grundlage für die Erforschung des Revitalisierungseffektes benützen zu können.

Verwendet wurden weiße Laboratoriumsratten beiderlei Geschlechts und eines jeweils bestimmten Alters. Die Haltung erfolgte

in Einzelkäfigen, Futter (Gemisch aus Teigwaren, Hafer, Hackfleisch, Hefe, Mineralstoff-Vitamin-Spurenelement-Präparat) und Wasser stand den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung. Die Ratten wurden einer täglichen Inspektion und einer wöchentlichen Gewichtskontrolle unterzogen. Die Vorbehandlung bestand in der s. c. Verabreichung von Placenta- oder Testis-Siccacell-Suspension (1 Ampulle in 5,5 ml steriler Ringerlösung), pro Tier 0,25 ml – das entspricht der vierfachen üblichen Dosis des Menschen (1 Ampulle Siccacell pro 70 kg Körpergewicht) – entweder zu Versuchsbeginn (Versuch III. Labyrinth) oder zu Versuchsbeginn und eine zweite Injektion 5 Monate danach (Versuche V. Haut, VI. Aorta, VII. Kollagen, VIII. Thyreoidea, IX. Gewebeatmung und X. Mitochondrien). In den Versuchsreihen mit 2 Injektionen kamen die Ratten im Alter von 20 bis 24 Monaten zum Versuchsabschluß. Im Versuch IV (Aktivitätsstudien) wurde neben Placenta- auch Leber-Siccacell verwendet.

b) Biostatistik

In der gesamten Biologie, Physiologie und Medizin gewinnt in den letzten Jahrzehnten in zunehmendem Umfang die Erkenntnis Raum, daß die Biostatistik ein ausgezeichnetes Hilfsmittel der Erkenntnisgewinnung für alle Zweige dieser Wissenschaften abgeben kann. Das Wesen der Statistik besteht in der Erfassung, Beschreibung und Vergleichung von Häufigkeiten (Wagner, 1957). Es kann also alles durch Zählung, Wägung oder Messung Typologisierbare statistisch bearbeitet werden, und erst die Anwendung geeigneter statistischer Methoden gibt den gefundenen Zahlen wissenschaftlichen und praktischen Wert. Der häufig zitierte Ausspruch: «Mit Statistik kann man alles beweisen» ist falsch, dagegen ist richtig der Satz: «Ohne Statistik kann man sehr wenig beweisen» (Hosemann, 1949).

In den vergangenen Jahrzehnten hat man immer mehr erkannt, daß in Technik und Naturwissenschaft die statistischen Methoden unentbehrlich für die Beurteilung von Beobachtungen sind. Diese Tatsache hat ihren Grund darin, daß gerade in diesen Wissenschaften Beobachtungen oder Experimente nicht beliebig oft und exakt wiederholbar sind. Besonders in den naturwissenschaftlichen Disziplinen ist es einerseits unmöglich, die Versuchstechnik oder

die Beobachtungsmethoden völlig gleich zu halten, andererseits ergeben sich in der Medizin infolge der ständig wechselnden physiologischen Regulationsmechanismen unvermeidbare Verschiedenheiten der Beobachtungsobjekte, auch wenn die Beobachtungen am selben Objekt, aber zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen werden. Das Ergebnis von Beobachtungen oder Versuchen sind stets Einzelwerte. Alle theoretisch möglichen, unendlich vielen, unter den gleichen Bedingungen zustande gekommenen Beobachtungen bezeichnet man als Grundgesamtheit oder Kollektiv (population). Um absolut sichere Aussagen machen zu können, müßte die Grundgesamtheit zur Gänze untersucht werden. Da dies unmöglich ist, gewinnen wir unsere Werte von einer Stichprobe (sample). Als Stichprobe bezeichnet man die Gesamtheit der zufällig aus der Grundgesamtheit ausgewählten Einzelbeobachtungen. Damit geht allerdings die Sicherheit der Aussage verloren, an deren Stelle die Wahrscheinlichkeit (probability, p) tritt. Nur mit Hilfe der statistischen Methoden, deren grundlegendes Element die Wahrscheinlichkeitsrechnung ist, können wir brauchbare Aussagen über Beobachtungen machen, indem wir die Wahrscheinlichkeit unserer Aussagen angeben können.

In einer Beobachtungs- oder Versuchsreihe, einer Stichprobe also, nehmen die einzelnen Ergebnisse nicht denselben Wert an, sondern zeigen eine gewisse Streuung um einen Mittelwert. An Hand zahlreicher Einzelbeobachtungen kann man die daraus erarbeiteten Gesetzmäßigkeiten mit gewissen Korrekturen schließlich auf die Grundgesamtheit übertragen und so die Eigenschaften der Grundgesamtheit erschließen, was einen bedeutenden Zweig der Statistik darstellt.

Die Beobachtungen in den Naturwissenschaften bringen im wesentlichen zwei in ihrer Art verschiedene Ergebnisse:

1. Ergebnisse mit einer einzigen Veränderlichen: Diese Variable kann mit gewissen Wahrscheinlichkeiten verschiedene Werte annehmen. Die statistische Bearbeitung derartiger Ergebnisse gibt Aufschluß über deren Mittelwert ($\bar{x}$), die Streuung (s^2), und die Form der Verteilung.

2. Ergebnisse, die die Beziehung zwischen zwei oder mehreren Veränderlichen beinhalten: Die Beziehung zwischen Veränderlichen kann eine funktionale sein, das heißt, daß zu jedem Wert der einen

Veränderlichen nur ein einziger Wert der anderen gehört. Diese Art der Beziehung findet man häufig in der Technik. In der Medizin sowie in der Biologie im allgemeinen stehen die Variablen in stochastischer Abhängigkeit. Jeder Variablen x können mehrere Variable y zugeordnet werden und umgekehrt.

Die Veränderlichkeit kann quantitativer oder qualitativer Art sein. Die Angabe der Abhängigkeit erfolgt mit dem Bestimmtheitsmaß (B) oder dem Korrelationskoeffizienten (r oder ρ). Bei der statistischen Auswertung ist es vorteilhaft, die Werte zunächst in einer übersichtlichen graphischen Darstellung zusammenzufassen. Die Form der graphischen Darstellung richtet sich nach der Art der Ergebnisse. Am meisten verwendet werden Histogramm und Häufigkeitspolygon für eine diskrete Verteilung der Wahrscheinlichkeit, für die kontinuierliche Verteilung die entsprechende Kurve. Die weitere Beschreibung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe der statistischen Meßzahlen (Mittelwert, am häufigsten arithmetisches Mittel $\bar{x}$, Standardabweichung s, Standardfehler $s_{\bar{x}}$, Regressions- (b) und Korrelationsmaße (r oder ρ). Die Angabe des arithmetischen Mittels allein ist unzureichend, da es leicht zu falschen Schlüssen führt, weil es über die Form der Verteilung nichts aussagt. Eine Verteilung ist erst durch die Angabe aller ihrer Parameter definiert (zum Beispiel des Mittelwertes und der Streuung bei der in der Medizin am häufigsten vorkommenden Normalverteilung).

Einen weiteren Schritt in der statistischen Auswertung stellt das Prüfen der Ergebnisse dar. Dabei hat man zu untersuchen, ob die eingetretenen Ereignisse mit denen der Grundgesamtheit übereinstimmen, oder ob zwischen zwei oder mehreren Versuchsreihen statistisch gesicherte Unterschiede bestehen oder nicht. Die Statistik ergibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit die vorhandenen Unterschiede zwischen Stichproben und Grundgesamtheit oder zwischen mehreren Stichproben auch rein zufällig zustande kommen könnten. Die Sicherheitsschwelle (die Wahrscheinlichkeit des rein zufälligen Zustandekommens der Unterschiede) soll möglichst klein sein und in statistischen Auswertungen stets angegeben werden. Von Signifikanz oder statistischer Sicherheit spricht man konventionell bei einer Sicherheitsschwelle von maximal 5%. Um die Signifikanz feststellen zu können, wurden im wesentlichen zwei Arten von Testmethoden entwickelt: 1. Teste, die eine bestimmte Ver-

teilung der Häufigkeit der Merkmale voraussetzen, 2. verteilungsfreie Teste.

Im Hinblick auf die bei der statistischen Auswertung wichtigen Faktoren soll zu Beginn von Untersuchungen der Versuchsplan aufgestellt werden, wodurch die Bearbeitung der Ergebnisse wesentlich erleichtert oder überhaupt erst möglich wird. Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß die Kürze und Prägnanz statistischer Angaben das Literaturstudium bedeutend erleichtern, darüber hinaus macht vielfach die statistische Bearbeitung die Ergebnisse erst verwertbar, weil sonst ihre Mitteilung für eine kritische Beurteilung häufig unzureichend ist. Allerdings wird die Zahl der ohne statistische Auswertung «positiv» erscheinenden Versuche durch die statistische Bearbeitung wesentlich verringert; diese Einbuße an Quantität von Aussagen wird aber durch die Qualität der statistisch gesicherten Ergebnisse voll ausgeglichen.

III.

Labyrinthversuch

(Kment, A., 1959; Kment, A., 1961; Tschabrun, M., 1959)

Einleitung

Über den Anteil der verschiedenen Sinne an der Lösung von Labyrinthaufgaben stellt Dembowski (1955), indem er sich auf die Arbeiten von Watson, Lashley und Ball, Vincent, Carr und Wolfle beruft, zwei «Tatsachen» fest: 1. Nicht ein Sinn des Tieres ist als solcher für die Beherrschung des Labyrinths unerläßlich, und 2. Es gibt keinen einzigen Sinn, der nicht unter gewissen Bedingungen für die Lösung der Aufgabe entscheidend werden könnte. Die Fähigkeit des «Lernens», welche den in vorliegendem Versuch verwendeten Ratten zugeschrieben wird, darf als Tatsache angesehen werden. Die Ausbildung von Assoziationen scheint nach Dembowski (1955) schon bei einzelligen Lebewesen *(Paramaecium caudatum)* möglich zu sein. Mit Bestimmtheit kann, angefangen von den höheren Metazoen, von einem Merkvermögen gesprochen werden. Frauchiger (1944) spricht Tieren ein «Eindrucksgedächtnis» zu. Hofstätter (1957) ist der Auffassung, daß das Gedächtnis – die «Mneme» – eine allgemeine Funktion des tierischen Organismus

sei. Schließlich sagt Fischel (1956) wörtlich: «Bei Erlernthaben einer Verhaltensweise entsteht ein diese erhaltendes engrammnemisches Korrelat.» In den Dressurversuchen von Dinsmoor (1952) erwies sich das Merkvermögen von Ratten als außerordentlich. 80 % seiner Tiere erinnerten sich nach einer dreißigwöchigen Pause noch daran, daß das Futter durch Betätigung eines Hebels zu beschaffen war.

Methode

Zur Beantwortung der Frage, ob bei Ratten das Lern- und Merkvermögen durch Siccacell-Injektionen beeinflußt werden kann, wurde die Tieflabyrinthmethode gewählt. In engerem Sinn handelte es sich um ein vielfaches T-Labyrinth (Abbildung 132), welches die Tiere zu bewältigen hatten. Der Irrgang war auf einer fixen, waagrechten Plattform aufgebaut und hatte eine Länge von 185 cm und eine Breite von 130 cm. Die 15 cm hohen Schluchtenwände standen 10 cm voneinander entfernt. Der Start ist auf der Skizze mit «s», das Ziel (Futternapf) mit «z» gekennzeichnet. Das Labyrinth wies 7 Wegkreuzungen auf, das heißt, es war siebenmal zwischen richtiger und falscher Laufrichtung zu wählen.

a) Gewöhnungsläufe. Einen Tag nach der Injektion des Zellmaterials wurde mit den Läufen begonnen; die Tiere sollten sich vorerst an das Labyrinth gewöhnen. Zu diesem Zweck wurden jedem Tier vier Läufe ohne Zeit-(Fehler-)nehmung gestattet, wobei unter

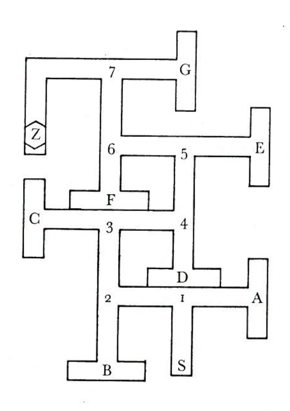


Abbildung 132

«einem Lauf» zu verstehen ist, daß das Tier nur so lang im Labyrinth belassen wurde, bis es am Futterplatz «z» angelangt war.

b) Lernversuch. Nach Beendigung der Gewöhnungsläufe wurde für jeden Lauf die Zeit in Sekunden gestoppt, die Anzahl der Fehler notiert und daraus der Index errechnet. Als Fehler wurde das Einschlagen der falschen Richtung an einer Wegkreuzung gewertet, und zwar mußte das Tier die Sackgasse mindestens so weit begangen haben, daß zur Richtungsänderung eine Wendung um 180 Grad nötig war. Der Index, als Ausdruck für Zeit und Fehler, errechnete sich nach der Formel $I = Z (F + 1)$. Mit zunehmender Laufzahl wurden bei allen Tieren die Indices niedriger, so daß schließlich von einem «Beherrschen» des Labyrinths gesprochen werden konnte. Nach 68 Versuchstagen folgte eine Pause von 12 Tagen, während welcher die Ratten in den Boxen blieben. 8 Tage lang wurde normal gefüttert, die letzten 4 Tage wurden die Rationen um ein Drittel gekürzt.

c) Merkversuch. Für diesen Versuch waren ursprünglich drei Läufe vorgesehen; doch stellte sich heraus, daß die deutlich unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb der Gruppen, wie sie sich nach dem 1. und 2. Lauf ergeben hatten, beim 3. Lauf schon sehr ausgeglichen waren, was nur mit einem neuerlichen Lernbeginn zu deuten war. Es wurden also nur zwei, auf 2 Tage verteilte Läufe ausgewertet.

Tiermaterial

(Siehe IIa, Seite 409)

Die 120 Versuchstiere waren in drei Gruppen eingeteilt, ihr Alter betrug zu Beginn des Versuches 1 Jahr:
Gruppe I = Kontrollgruppe (40 Ratten)
Gruppe II = vorbehandelt mit Testis-Siccacell (40 Ratten)
Gruppe III = vorbehandelt mit Placenta-Siccacell (40 Ratten)

Pro Tier wurde einmal, zu Versuchsbeginn, Siccacell s. c. injiziert.

Versuchsergebnisse

1. Lernversuch

a) Laufzeit: Abbildung 133 veranschaulicht für alle drei Gruppen die Entwicklung der Laufzeiten in der Lernversuchsperiode. Aus dem Verlauf der Kurven ist zu entnehmen, daß die Gewöhnungs-

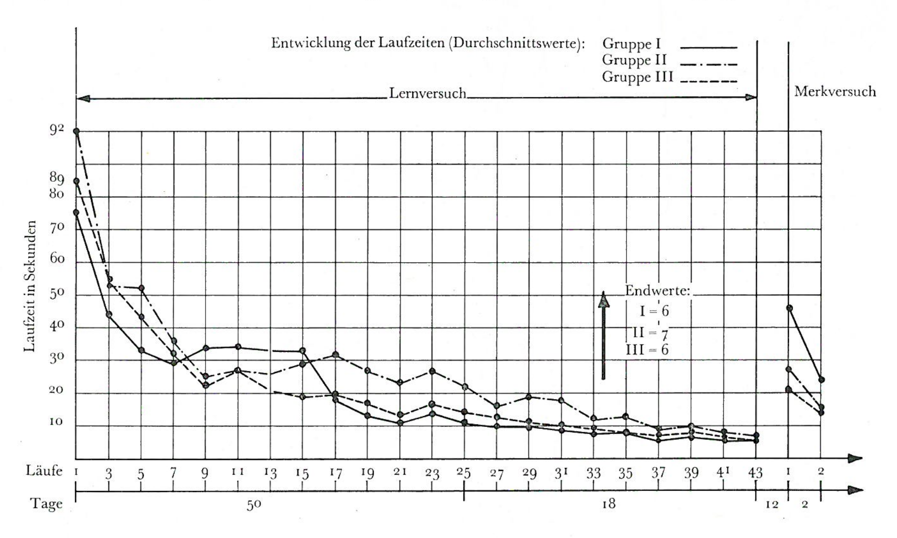


Abbildung 133

läufe viel Zeit in Anspruch nahmen. Der erste Lauf auf Zeit lag noch an der Eineinhalb-Minuten-Grenze, dann jedoch verzeichnen alle Tiere bis Lauf 7 (entspricht 14 Tagen) den wesentlichsten Fortschritt, indem sie ihre Schnelligkeit um das Dreifache erhöhen. In der Folge ist, bis zum Ende des Lernens – von kleinen Rückfällen abgesehen – noch eine allmähliche Verbesserung zu sehen, welche in relativ kleinen Zeitwerten endet. Gruppe II liegt in der Mittel- und Endphase konstant höher als die beiden anderen Gruppen.

b) Fehler: (Abbildung 134). Sämtliche Tiere begannen mit einer durchschnittlichen Fehleranzahl von 2,6–3,0. Bis Lauf 13 (26 Tage) ist ein beträchtlicher Abfall bis 1,2–1,0 zu vermerken. Bei allen Gruppen ist zur Zeit des 17. Laufes (34 Tage) eine kurze negative Schwankung vorhanden, die bei Gruppe II am deutlichsten ausgeprägt erscheint. Die Kurven fallen dann gemeinsam bis auf Endwerte von 0,3–0,1 ab, wobei sich Gruppe II wiederum deutlich über den Gruppen I und III bewegt.

c) Indices: (Abbildung 135). Es ergeben sich allgemein vom 1. bis zum 3. Lauf (1–6 Tage) durch Multiplikation von Fehler und Zeit sehr hohe Werte. Im Anschluß fallen die Kurven bis Lauf 9 (18 Tage) steil ab.

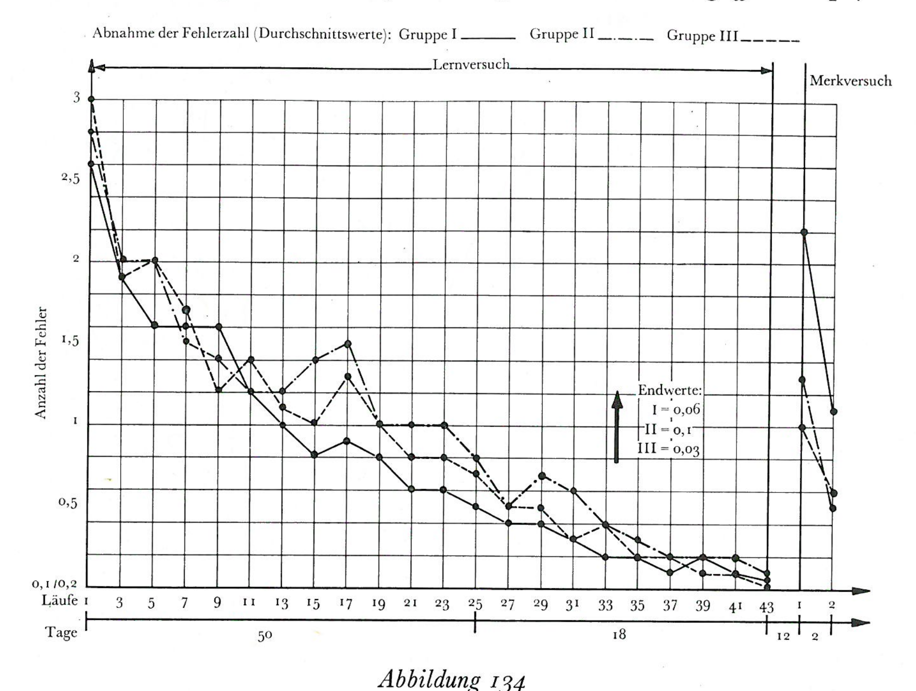


Abbildung 134

Im Mittelteil steigt wieder Gruppe II mit 3 Zacken bedeutend an, während die beiden anderen Gruppen, nahezu parallel verlaufend, gegen die Endwerte (6, 8 und 7) abfallen. Gruppe II erreicht, trotz Verschiebung im Mittelfeld, ebenfalls einen niederen Endwert.

2. *Merkversuch*

Zeit, Fehler und Index: (Abb. 133, 134 und 135). In der graphischen Darstellung der Ergebnisse des Merkversuches tritt uns ein großer Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit Trockenzellen behandelten Gruppen, hinsichtlich Laufzeit, Fehler und Index, entgegen. Der 1. Lauf nach 12tägiger Pause zeigt, daß die Gruppe I in allen drei Faktoren wesentlich höhere Werte aufweist, das heißt gegenüber den Gruppen II und III ein schlechteres Merkvermögen hatte. Um jede Zufälligkeit dieser Daten auszuschließen (siehe auch statistische Auswertung), wurde noch ein zweiter Lauf für die Beurteilung herangezogen, welcher das gleiche Resultat zeitigte.

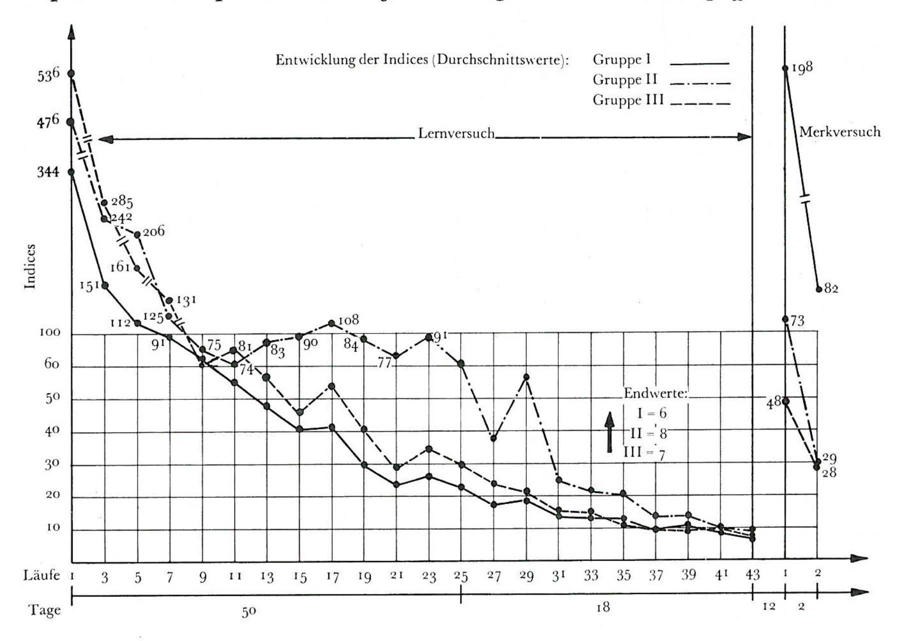


Abbildung 135

In Abbildung 136 sind die Durchschnittswerte der Laufzeit, der Fehleranzahl und des Index zwischen Beginn und Ende des Lern- bzw. Merkversuches im Stabdiagramm gegenübergestellt.

Als *statistische Methode* wurde der «t»-Test nach STUDENT angewendet. Im Lernversuch wurden jeweils die ersten 3 und die letzten 3 Läufe verglichen, im Merkversuch die ersten 2 und die letzten 2 des Lernversuches mit den 2 Läufen des Merkversuches.

a) Signifikanz des Lernerfolges

Die ersten 3 Läufe wurden mit den letzten 3 Läufen des Lernversuches hinsichtlich Zeit, Anzahl der Fehler und daraus errechnetem Index verglichen. In allen drei Gruppen ist der Lernerfolg, was Laufzeit, Fehleranzahl und Index betrifft, hoch gesichert.

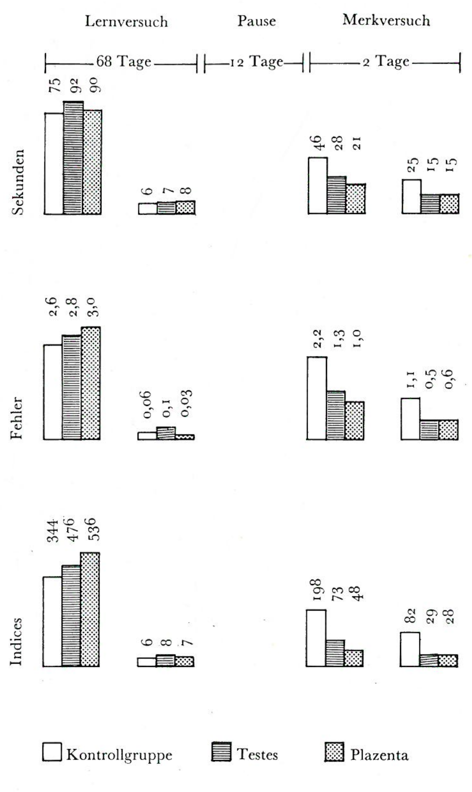


Abbildung 136

Gruppe I	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 18{,}7$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}55$	
	Index:	$s_{\bar{x}} = 111{,}06$	
Gruppe II	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 27{,}7$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}50$	$p < 0{,}001$
	Index:	$s_{\bar{x}} = 217{,}90$	
Gruppe III	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 36{,}8$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}85$	
	Index:	$s_{\bar{x}} = 278{,}21$	

b) Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander im Lernversuch hinsichtlich Laufzeit, Fehleranzahl und Index

α) Beginn des Lernversuches. Ein signifikanter Unterschied bei den 3 Beobachtungsarten zwischen den Gruppen I und II und zwischen den Gruppen I und III besteht nicht.

Gruppe I : Gruppe II	Zeit:	$s_{\bar{x}_{I}} = 100{,}53$	$p < 0{,}7$
		$s_{\bar{x}_{II}} = 160{,}99$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}59$	$p < 0{,}3$
		$s_{\bar{x}_{II}} = 0{,}99$	
	Index:	$s_{\bar{x}_{I}} = 112{,}50$	$p < 0{,}2$
		$s_{\bar{x}_{II}} = 250{,}94$	
Gruppe I : Gruppe III	Zeit:	$s_{\bar{x}_{I}} = 100{,}53$	$p < 0{,}5$
		$s_{\bar{x}_{III}} = 38{,}80$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}59$	$p < 0{,}1$
		$s_{\bar{x}_{III}} = 0{,}88$	
	Index:	$s_{\bar{x}_{I}} = 112{,}50$	$p < 0{,}1$
		$s_{\bar{x}_{III}} = 311{,}12$	

β) *Ende des Lernversuches.* Auch hier ließ sich, mit Ausnahme der Laufzeit von Gruppe II, kein signifikanter Unterschied ermitteln. Die Laufzeit der Gruppe II war am Ende des Lernversuches signifikant verlängert gegenüber jener der Gruppe I.

Gruppe I : Gruppe II	Zeit:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}80$ $s_{\bar{x}_{II}} = 1{,}05$	$p < 0{,}01$
	Fehler:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}12$ $s_{\bar{x}_{II}} = 0{,}12$	$p < 0{,}6$
	Index:	$s_{\bar{x}_{I}} = 1{,}61$ $s_{\bar{x}_{II}} = 1{,}80$	$p < 0{,}1$
Gruppe I : Gruppe III	Zeit:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}80$ $s_{\bar{x}_{III}} = 0{,}85$	$p < 0{,}4$
	Fehler:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}12$ $s_{\bar{x}_{III}} = 0{,}12$	$p < 0{,}6$
	Index:	$s_{\bar{x}_{I}} = 1{,}61$ $s_{\bar{x}_{III}} = 2{,}03$	$p < 0{,}3$

c) Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander im Merkversuch hinsichtlich Laufzeit, Fehleranzahl und Index

Bei allen drei untersuchten Faktoren läßt sich ein gesicherter Unterschied zwischen den Gruppen I und II und den Gruppen I und III ermitteln.

Gruppe I : Gruppe II	Zeit:	$s_{\bar{x}_{I}} = 9{,}77$	$p < 0{,}01$
		$s_{\bar{x}_{II}} = 5{,}02$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}40$	$p < 0{,}001$
		$s_{\bar{x}_{II}} = 0{,}26$	
	Index:	$s_{\bar{x}_{I}} = 62{,}02$	$p < 0{,}001$
		$s_{\bar{x}_{II}} = 20{,}60$	
Gruppe I : Gruppe III	Zeit:	$s_{\bar{x}_{I}} = 9{,}77$	$p < 0{,}001$
		$s_{\bar{x}_{III}} = 3{,}06$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}_{I}} = 0{,}40$	$p < 0{,}001$
		$s_{\bar{x}_{III}} = 0{,}30$	
	Index:	$s_{\bar{x}_{I}} = 62{,}02$	$p < 0{,}001$
		$s_{\bar{x}_{III}} = 11{,}65$	

d) Vergleich des Merkversuches mit dem Lernversuch hinsichtlich Laufzeit, Fehleranzahl und Index innerhalb der einzelnen Gruppen

a) Beim Vergleich des Merkversuches mit dem Beginn des Lernversuches stellt sich heraus, daß das Merkvermögen der Gruppen II und III hinsichtlich aller drei untersuchten Faktoren statistisch hoch gesichert ist (mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1 %), während in Gruppe I die statistische Sicherheit nur mit einer Zufallswahrscheinlichkeit von 2 % bei Laufzeit und Fehler und von 5 % beim Index vorhanden ist.

Gruppe I	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 21{,}20$	$p < 0{,}02$
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}64$	$p < 0{,}02$
	Index:	$s_{\bar{x}} = 121{,}09$	$p < 0{,}05$
Gruppe II	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 23{,}34$	$p < 0{,}001$
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}64$	$p < 0{,}001$
	Index:	$s_{\bar{x}} = 118{,}61$	$p < 0{,}001$
Gruppe III	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 32{,}67$	$p < 0{,}001$
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}73$	$p < 0{,}001$
	Index:	$s_{\bar{x}} = 86{,}78$	$p < 0{,}001$

b) Beim Vergleich des Merkversuches mit dem Ende des Lernversuches ergibt sich, daß alle Gruppen in signifikanter Weise «vergessen» hatten, denn es waren die Laufzeit-, Fehler- und Indexergebnisse des Merkversuches signifikant schlechter als die des Lernversuches.

Gruppe I	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 9{,}45$	$p < 0{,}001$ (für alle)
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}39$	
	Index:	$s_{\bar{x}} = 61{,}55$	
Gruppe II	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 4{,}40$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}24$	
	Index:	$s_{\bar{x}} = 18{,}00$	
Gruppe III	Zeit:	$s_{\bar{x}} = 2{,}47$	
	Fehler:	$s_{\bar{x}} = 0{,}22$	
	Index:	$s_{\bar{x}} = 9{,}41$	

Im Lernversuch war demnach eine Beeinflussung durch s. c. Behandlung mit Trockenzellen nicht festzustellen; der Merkversuch ließ sie jedoch in signifikanter Weise erkennen: sowohl die Testis- als auch die Placentazellen bewirkten eine signifikante Verminderung der Laufzeit und der Fehleranzahl gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Tatsache geht auch aus dem Vergleich des Merkversuches mit dem Beginn und dem Ende des Lernversuches hervor: Gruppe I näherte sich mehr dem Ausgangsniveau des Lernversuches und entfernte sich zugleich mehr vom Erfolg des Lernversuchendes als die Gruppen II und III.

Diskussion

Bei den verwendeten Ratten war das Erlernen des Labyrinths ein «Lernen am Erfolg», das heißt, ihr Verhalten trat unter gewissen Reizgegebenheiten auf, die sich für das Zustandekommen einer für die Ratte erstrebenswerten Lage (Auffinden des Futterplatzes) als tauglich erwiesen hatten (Hofstätter, 1957).

Während der einzelnen Läufe steigerte sich die Laufgeschwindigkeit bei allen Ratten, je näher sie dem Ziel waren. Hull (1932) spricht in diesem Zusammenhang von einem «Zielgefälle» (goal gradient) des Reizes, der vom Ziel ausgeht und das Verhalten der Ratten im Irrgarten beherrscht. Im Laufe des Lernversuches wurden einige Sackgassen häufiger, andere weniger oft besucht. Die am häufigsten begangenen Blindgänge waren A, C und E (siehe Abbildung 132), wobei C wieder den Vorzug vor A und E hatte. Dashiel (1930) verwendete für seine Untersuchungen ein Labyrinth mit der gleichen Anordnung und stimmt mit unserer Beobachtung überein. Der Lernversuch wurde zu einem Zeitpunkt beendet, als man sagen konnte, die Tiere «beherrschten» das Labyrinth. Es gilt heute als richtig, ein Labyrinth dann als beherrscht anzusehen, wenn zum erstenmal unter 10 Läufen 8 richtig (fehlerlos) sind (Fischel, 1953). An diesem Grundsatz wurde in vorliegender Arbeit festgehalten, indem die Läufe so lange fortgesetzt wurden, bis der Durchschnitt der Tiere diese Forderung erreicht hatte. Für das Erlernen des Labyrinths waren 43 Läufe notwendig. Da es sich dabei um sogenannte T-Entscheidungen handelte, darf eine annähernde Übereinstimmung mit den Aussagen von Bierens de Haan und Bijlmer (1939) festgestellt werden, welche Laboratoriumsratten und weiße Mäuse

ein Labyrinth ähnlicher Art durchlaufen ließen und 36 Läufe brauchten, bis von einem «Beherrschen» in unserem Sinn die Rede war. WARREN (1937) spricht von 37 Läufen in seinem T-Labyrinth.

In den vorliegenden Labyrinthversuchen können wir von einer Revitalisation nur dann sprechen, wenn sie das Tier in seiner Verhaltensweise zeigt. Der Lernversuch erbrachte durch die Trockenzellverabfolgung keinen gesicherten Unterschied zwischen Gruppe I und den vorbehandelten Gruppen. Der Merkversuch aber zeitigte Ergebnisse, welche dafür sprechen, daß eine intensive Beeinflussung höherer, zentralnervöser Fähigkeiten bei Ratten nach Injektion von Trockenzellen zustandekommt.

Es ist durchaus möglich, daß der von NIEHANS (1954), SCHMIDT (1957), BAUER (1956), RIETSCHEL (1957) und GRIMMER (1955) vertretene Revitalisierungseffekt (Besserung des Allgemeinzustandes) bei Tieren eine längere Entwicklungszeit aufweist als beim Menschen. Das «Merken» als zentralnervöse Funktion erwies sich jedenfalls, sowohl bei der Testis- als auch bei der Placentabehandlung, gegenüber der Kontrollgruppe als statistisch hoch gesichert. RIETSCHEL (1957) führt gerade die Behandlung gewisser altersbedingter zentralnervöser Störungen als ansprechendste Beispiele dafür an, daß die Zellulartherapie vielfach «Revitalisierungseffekte» kürzerer oder längerer Dauer erzielen kann.

IV. Aktivitätsstudien

(KMENT, A., 1956, KMENT, A., 1959)

Einleitung

BETHE (1943) bringt in seinen Studien über die periodische Unterbrechung rhythmischer Lebensvorgänge unter 20 Beispielen 7 über die tierische Lokomotion. Alle entsprechen dem Luciani-Typ (1873), das heißt, auf plötzlich ein- oder aussetzende, rhythmische Bewegungen folgen Ruhepausen. Ratten und Mäuse zeigen im Verlauf von Minutenbruchteilen oder wenigen Minuten solche Aktivitätsausbrüche. Meistens werden diese Bewegungsstöße zu einem Aktivitätsschub zusammengefaßt.

SZYMANSKI (1918) fand für die Ratte eine durchschnittliche Zahl von 10 Aktivitätsschüben pro Tag. Diese Werte stimmen mit jenen

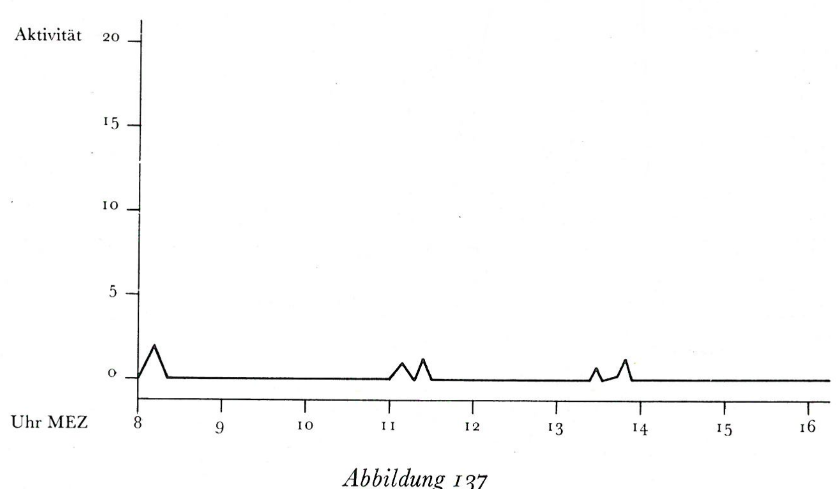


Abbildung 137
Aktivitätsverhalten einer alten weiblichen Ratte (Normaltier)

anderer Autoren überein (ASCHOFF, 1954, u. a.). Die Regelmäßigkeit der Schubfolge weist auf zentralnervöse Vorgänge hin (Abbildung 137).

Untersuchungen der Lokomotion sind sehr geeignet, Einblick in den Aktivitätszustand und in die Aktivitätsverteilung der Versuchstiere zu geben. Die Ratte ist überwiegend dunkelaktiv, ähnlich der Hausmaus. So wie diese unterbricht auch sie ihren Ruhestand durch Aktivitätsschübe. Die Zeitabschnitte zwischen den Laufanfällen sind bei der Ratte größer als bei der Maus. Die Aktivitätsperiode der Ratte drückt sich also vorwiegend in Schüben aus; diese liegen bei Licht zwischen der fast völligen Ruhe des Goldhamsters und den in Abständen von 2,0 bis 2,5 Stunden einsetzenden Aktivitätsschüben der weißen Maus (ASCHOFF, 1954). Wohl ist die Lokomotion nur eine der vielen periodischen Tagesfunktionen eines Tieres, doch kann die motorische Unruhe höher organisierter Lebewesen als Ausdruck des Gesamtbefindens angesehen werden, und sie ist ohne Störung der Versuchstiere quantitativ festzustellen. Aus den angeführten Tatsachen und bisher vorliegenden Befunden mit Trockenzellen interessierte es daher, ob lyophilisiertes Organmaterial die Aktivität alter, weiblicher Ratten verändert.

Methode

Die lokomotorische Aktivität wurde in Lauftrommeln (Modell JAQUET) jeweils zwischen 8 Uhr und 16 Uhr registriert. Als Aktivitätseinheit ist eine ganze Trommelumdrehung anzusehen. Bei dem verwendeten Untersuchungsgerät bestand eine direkte Verbindung des Nestkäfigs mit der Trommel; die Ratte konnte demnach zwischen dem Käfig, der für sie groß genug war, und der Trommelbasis wählen. Im Untersuchungsraum herrschte eine Temperaturkonstanz von 22°C und gleichbleibende Beleuchtung; Schall und Erschütterung waren weitgehend ausgeschaltet.

Tiermaterial (siehe II a, Seite 409)

Zur Untersuchung wurden 16 über 2 Jahre alte, senile Laboratoriumsratten eingesetzt. In Vorversuchen wurde die Aktivität als bedeutend herabgesetzt festgestellt (vielfach verbringen die alten Ratten die Versuchszeit schlafend in der Trommel) und nur solche Ratten wurden verwendet. Das Dosierungsschema für die Leber- und Placenta-Trockenzellen findet sich bei den Versuchsergebnissen.

Versuchsergebnisse

In einer Versuchsreihe von 6 Ratten ergab die zweimalige (3. und 4. Tag) s. c. Verabreichung von je 0,5 ml Leber keinen Einfluß auf die Aktivität der Versuchstiere (Abbildung 138). Ebenso unbeeinflußt blieben die Ratten durch s. c. Injektion (6., 7. und 8. Tag) von je 0,3 ml Leber. Ab dem 10. Versuchstag wurde pro Tier und Tag 0,1 ml Leber bis zum 18. Versuchstag verabreicht. Es ergab sich keine Aktivitätsveränderung. Ab dem 19. Versuchstag erhielten die Ratten pro Tag 0,1 ml Placenta (19. bis 27. Tag). Die Tiere der Versuchsgruppe zeigten eine merkliche Zunahme ihrer Aktivität. Die statistische Berechnung (t-Test, STUDENT) der Aktivitätswerte ergab Signifikanz. Eine zweite Versuchsreihe (Abbildung 139) mit 10 weiblichen alten Ratten ergab bei dreimaliger s. c. Injektion (1., 2. und 3. Tag) von je 0,1 ml Placenta pro Tier, für 70% der Versuchstiere ab dem 6. Tag eine eindeutige Aktivitätssteigerung, die bis zum 10. Tag anhielt (2 Wochen Beobachtungszeit) und dann wieder die normalen Durchschnittwerte unbehandelter Ratten erreichte.

Diskussion

Die durchgeführten Orientierungsversuche zeigen, daß Placenta-Trockenzellen die Aktivität alter, weiblicher Ratten im Lauftrommelversuch zu steigern vermögen. Mit Leber-Trockenzellen gelang dies nicht. Die Aktivitätszunahme scheint beträchtlich von der Dosis abhängig zu sein. Kleinere Placentazellmengen begünstigen die Lokomotionssteigerung, während höhere Dosen die Aktivität un-

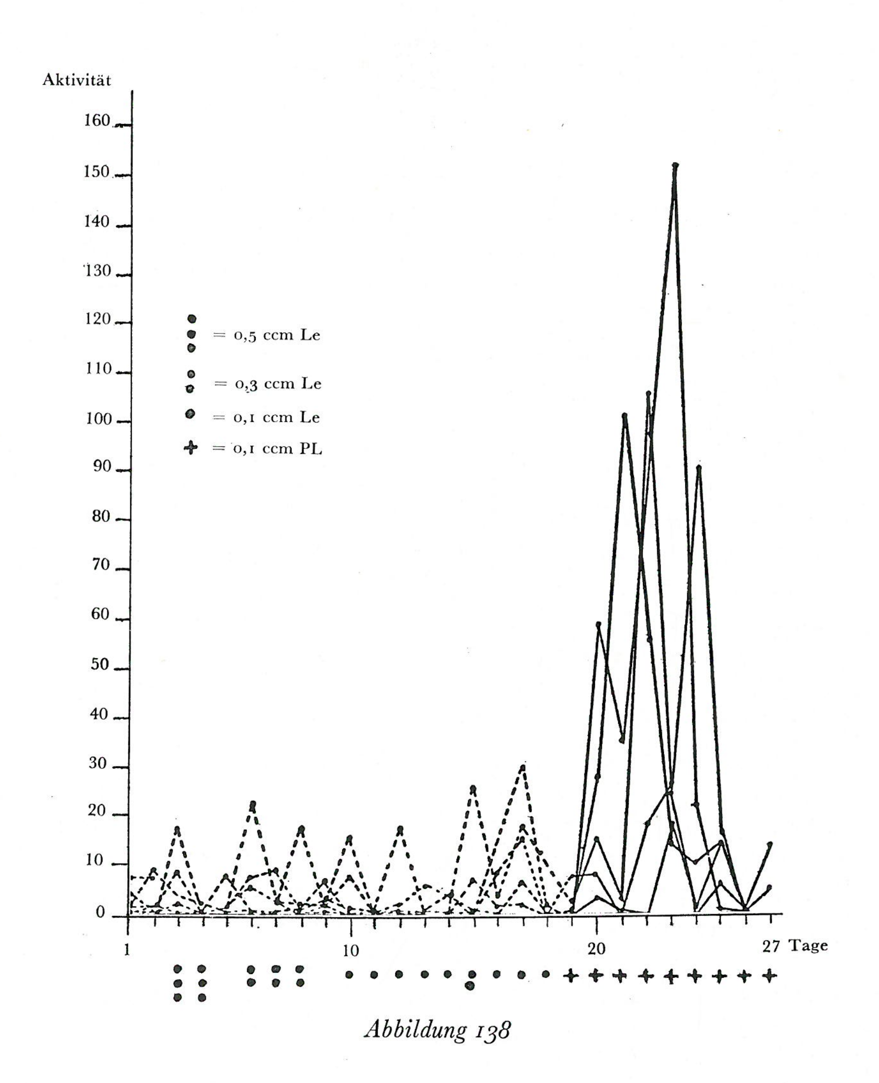


Abbildung 138

beeinflußt lassen oder vielleicht hemmen. Erinnert sei in diesem Zusammenhang an die Arbeiten von ASCHOFF und MEYER-LOHMANN (1954), FECHT (1953), HÖFS (1954), HUSSLEIN (1953), JORES (1949), KLUDAS (1954), KNÜCHEL und KUHN (1954).

V. Elastizität und Rißfestigkeit der Haut

(KMENT, A., LEIBETSEDER, J., SUMMER, E., 1962; SUMMER, E., 1961)

Einleitung

Über die Altersabhängigkeit der Haut berichten in den letzten Jahren unter anderen MA und COWDRY (1950) und TATTERSAL (1950)

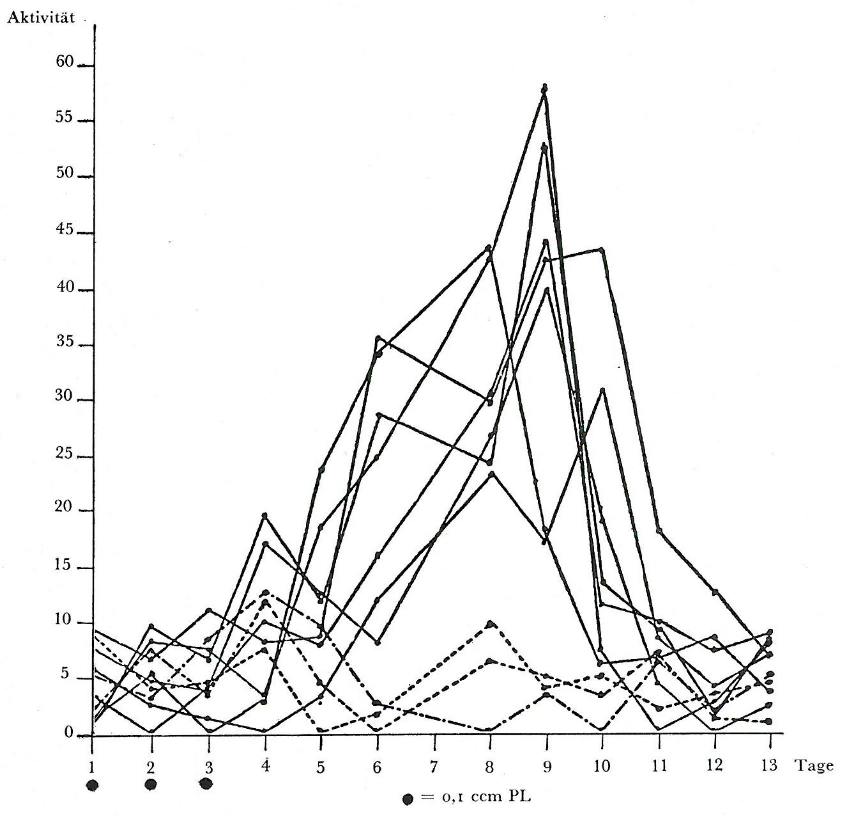


Abbildung 139

und geben an, daß die kollagenen Fibrillen der Haut im Laufe des Lebens abnehmen. Durch elektronenoptische Untersuchungen konnten TELLER, VESTER und POHL (1957) nachweisen, daß die kollagenen Fibrillen im Alter dünner werden. LEUTERT (1960) spricht von einer körnigen, altersabhängigen Degeneration der kollagenen Fasern der Haut. BÜRGER (1960) spricht auch bei der Haut von einer inneren Umstrukturierung und nicht von einem Verbrauch der elastischen Fasern mit zunehmendem Alter. Über die Altersabhängigkeit der Hautelastizität schreiben auch KIRK und KVORNING (1949), CHIEFFI (1950) und LEWIS und REIN (1956), und zwar alle im Sinne einer Elastizitätsverminderung mit zunehmendem Alter. Nach HERINGA und WEIDINGER (1941) nimmt auch das Wasserbindungsvermögen der Bindegewebskolloide mit dem Alter ab, und die Autoren erklären dadurch die Elastizitätsverminderung mit zunehmendem Alter. ROLLHÄUSER (1950) fand mit vorrückendem Alter eine Zunahme der Zugfestigkeit, bei gleichzeitiger Verminderung der Dehnbarkeit, und führt dies auf das Absinken des Wassergehaltes und eine bessere Bündelung und Durchflechtung der kollagenen Fasern im Laufe des Lebens zurück.

Methode

Die Messung der Elastizität und Rißfestigkeit der Haut wurde nach der Methode von WENZEL (1950) mit dem Schopperschen Materialprüfgerät durchgeführt. Nach Untersuchungen von WENZEL (1950) ergaben Versuche mit frischer Haut so starke Streuungen, daß die Ergebnisse praktisch nicht verwertbar waren. Daher unternahm er Versuche mit formalinfixierten Hautstücken und konnte zeigen, daß durch die Fixierung die Elastizitätsunterschiede deutlicher wurden und wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden konnten.

Von den für die Untersuchungen getöteten Ratten wurden Hautstücke auf folgende Weise präpariert: Nach einem Längsschnitt durch die Haut über der Wirbelsäule, angefangen vom ersten Brustwirbel bis 4 cm caudal davon, wurde die Haut senkrecht dazu mit einer Schere knapp hinter dem rechten Schulterblatt und 4 cm caudal davon durchtrennt und nach sorgfältiger Abpräparation der Tela subcutanea ein 4 cm breites und 5 cm langes Hautstück vom Körper abgesetzt. Diese rechteckigen Hautstücke wurden in 10prozentige Formalinlösung eingelegt und in dieser 6 Tage belassen.

Aus den auf diese Weise fixierten Hautstücken wurden, in der Richtung des Haarstriches, je drei 4 mm breite und 40 mm lange Streifen herausgeschnitten. Die Streifen lagen möglichst nahe beisammen, damit für die einzelnen Proben eines Tieres möglichst gleiche Dicke erzielt werden konnte. Trotzdem war aber die Dicke der Haut in den einzelnen Fällen verschieden und wurde jeweils berücksichtigt. Diese Hautstücke wurden in zwei Haltebacken eingespannt, die bei der Belastung Null 25 mm voneinander entfernt waren. Die eine der beiden Backen wurde durch einen Antrieb mit einer Geschwindigkeit von 100 m/min nach unten bewegt, während die zweite nach Übertragung dieser Zugkraft durch das Hautstück ein Gewicht mittels eines Hebels hob, wobei ein an dem Hebelarm des Gewichtes befindlicher Zeiger auf einer Skala die jeweilige Belastung angab. Die Verlängerungen waren auf einer zweiten Skala abzulesen.

Die Festigkeit wurde in der Weise bestimmt, daß die Hautstreifen mit gleichmäßiger Geschwindigkeit bis zum Zerreißen belastet wurden. Die Rißspannung wurde auf der Skala abgelesen und in kg/cm² ausgedrückt. Die Methode der Elastizitätsbestimmung bestand darin, daß je ein Hautstreifen jedes Tieres bis 50 kg pro cm² und je einer bis 80 kg/cm² belastet, die dabei erzielte Dehnung abgelesen, dann mit derselben Geschwindigkeit entlastet und bei der Spannung Null die bleibende Verlängerung (Dehnungsrückstand) bestimmt wurde. Die Beanspruchungszeit betrug eine Minute, ebenso die Entlastungszeit.

Tiermaterial

Für die Untersuchungen standen insgesamt 91 Laboratoriumsratten zur Verfügung, die in folgende Gruppen eingeteilt waren:

Gruppe J — Junge, 5 Monate alte Kontrolltiere, 11 Männchen und 12 Weibchen.

Gruppe A — Alte (bei Versuchsbeginn 12 Monate alt) Kontrolltiere, 6 Männchen und 16 Weibchen.

Gruppe I — mit Substanz I (Placenta-Trockenzellen) behandelte Tiere (bei Versuchsbeginn 12 Monate alt), 13 Männchen und 9 Weibchen.

Gruppe II — Mit Substanz II (Testis-Trockenzellen) behandelte Tiere (bei Versuchsbeginn 12 Monate alt), 13 Männchen und 11 Weibchen.

Gruppe K — Gruppe J und Gruppe A.

Versuchsergebnisse

Elastizität der Haut

a) Dehnung in % der ursprünglichen Länge (Tabelle 23): Da zwischen jungen und alten Kontrollratten keine signifikanten Unterschiede auftraten, wurden diese beiden Gruppen zur Gruppe K zusammengefaßt und gemeinsam statistisch bearbeitet. Beim Vergleich mit der Gruppe K stellte sich heraus, daß bei einer Belastung von 50 kg/cm² nur die Substanz II bei den männlichen Tieren eine signifikante Erhöhung der Dehnungsfähigkeit der Haut bewirkte, während bei der Belastung von 80 kg/cm² diese erhöhte Dehnungsfähigkeit der Haut durch die Substanz I und II bei den männlichen Ratten, durch die Substanz I bei den Weibchen zu erzielen war.

Tabelle 23

Elastizität der Haut
Dehnung in % der ursprünglichen Länge

Belastung: 50 kg/cm²

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	26,3	29,5	31,9	34,8	28,7	25,1	28,1	27,6
$s_{\bar{x}}$	3,28	2,33	1,85	2,83	2,58	1,54	2,73	2,66
p_J		0,5	0,2	0,1		0,3	0,9	0,8
p_A			0,5	0,2			0,4	0,5

Belastung: 80 kg/cm²

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	32,6	35,1	40,8	41,7	33,0	32,8	43,8	34,9
$s_{\bar{x}}$	2,6	3,51	3,02	2,54	2,99	2,21	2,93	2,48
p_J		0,6	0,01	0,02		0,9	0,02	0,7
p_A			0,2	0,2			0,01	0,6

b) Dehnungsrückstand in % der ursprünglichen Länge (Tabelle 24): Die Untersuchung des Dehnungsrückstandes ergab eine signifikante Altersabhängigkeit bei den männlichen und weiblichen Ratten, wobei sich der Dehnungsrückstand mit zunehmendem Alter vergrößerte. Eine Beeinflussung durch die Verabreichung von Placenta- und Testis-Trockenzellen konnte nicht nachgewiesen werden, da die Differenzen zwischen der Gruppe J und den behandelten Gruppen fast durchwegs signifikant waren.

Tabelle 24

Elastizität der Haut
Dehnungsrückstand in % der ursprünglichen Länge

Belastung: 50 kg/cm²

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	3,8	8,1	9,1	11,3	3,8	5,8	7,8	5,8
$s_{\bar{x}}$	1,55	0,96	0,58	1,45	0,93	0,84	1,05	1,45
p_J		0,05	0,01	0,01		0,2	0,01	0,3
p_A			0,4	0,1			0,2	1

Belastung: 80 kg/cm²

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	4,4	10,0	13,1	14,9	4,7	9,7	15,1	8,7
$s_{\bar{x}}$	0,83	1,45	1,11	1,80	1,07	1,12	1,63	1,64
p_J		0,01	0,001	0,001		0,01	0,001	0,1
p_A			0,2	0,05			0,02	0,7

c) Dehnungsrückstand in % der Dehnung (Tabelle 25): Auch bei diesem Kriterium zeigte sich die Altersabhängigkeit in ähnlicher Weise wie unter b). Ein Behandlungseinfluß war auch hier aus den gleichen Gründen wie unter b) nicht nachzuweisen.

Tabelle 25

Elastizität der Haut
Dehnungsrückstand in % der Dehnung

Belastung: 50 kg/cm²

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	10,5	30,4	28,7	31,2	11,4	22,2	26,8	18,4
$s_{\bar{x}}$	2,76	2,58	1,53	2,67	2,51	1,84	1,67	3,10
p_J		0,001	0,001	0,001		0,01	0,001	0,1
p_A			0,6	0,9			0,1	0,3

Belastung: 80 kg/cm²

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	12,5	32,2	31,6	33,9	12,2	28,5	33,7	22,9
$s_{\bar{x}}$	1,98	2,13	1,57	3,15	2,17	1,47	1,80	3,16
p_J		0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,02
p_A			0,9	0,7			0,05	0,2

Rißfestigkeit der Haut

Es wurde nach zwei Methoden ausgewertet:

a) Die Rißbelastungen wurden in quantitativer Hinsicht verglichen.

b) Aus den Dehnungskurven wurden die Zerreißungen in % der Gesamtzahl der Gruppe für die Belastungen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 kg/mm² ermittelt.

Zu a) (Tabelle 26): Die Untersuchungen ergaben, daß bei den männlichen Ratten die Rißfestigkeit der Haut in der Gruppe J signifikant höher lag als in der Gruppe A, das heißt, die Rißfestigkeit nimmt bei Ratten mit zunehmendem Alter in signifikanter Weise ab. Durch die Verabreichung der Substanzen I und II konnte die

Rißfestigkeit der Haut der alten Ratten so erhalten bleiben, daß sie gegenüber den jungen Kontrolltieren keinen signifikanten Unterschied aufwies, während gegenüber den alten Kontrolltieren der Unterschied in signifikanter Weise auftrat. Bei den weiblichen Ratten war eine ähnliche Tendenz zu erkennen, allerdings waren weder die Unterschiede zwischen jungen und alten Kontrolltieren noch die zwischen den Kontrollgruppen und den zellbehandelten Gruppen signifikant.

Tabelle 26

Rißfestigkeit der Haut
(Zerreißbelastung in kg/cm²)

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	130,38	89,00	117,16	121,73	119,54	92,25	109,53	88,50
$s_{\bar{x}}$	9,958	11,652	6,509	9,190	13,667	5,342	11,579	8,869
p_J		0,02	0,3	0,6		0,1	0,6	0,1
p_A			0,05	0,05			0,2	0,8

Zu b) (Tabelle 27): Bei der Beurteilung der Rißfestigkeit der Rattenhaut nach der zweiten Methode und nach der Auswertung der Ergebnisse mit dem Chi-Quadrat-Test ergab sich eine signifikant verminderte Rißfestigkeit der Haut bei den alten männlichen Ratten ab einer Belastung von 4 kg gegenüber den jungen Tieren, bei den weiblichen Ratten ab einer Belastung von 5 kg.

Durch die Injizierung von Placenta-, beziehungsweise Testis-Trockenzellen konnte die Rißfestigkeit der Haut in einem so hohen Maße erhalten werden, daß die Differenz zwischen den behandelten Gruppen beiderlei Geschlechts gegenüber der Gruppe A, ab dem genannten Gewicht, fast durchwegs signifikant war.

Diskussion

Wenzel (1950) findet mit zunehmendem Alter eine verminderte Festigkeit der Haut und glaubt, daß diese geringere Festigkeit als Symptom des allgemeinen Lebensabbaues aufzufassen ist. Die vor-

Tabelle 27

Rißfestigkeit der Haut
(Belastung: kg/mm²)

Zerreißungen in %

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	6	9	11
1 kg	0	0	0	0	0	0	0	0
2 kg	0	0	0	0	0	0	0	9,1
3 kg	0	0	0	7,7	25,0	18,7	11,1	62,6
4 kg	18,2	50,0	7,7	15,4	58,3	56,2	22,2	72,7
5 kg	27,3	66,7	30,8	38,5	66,7	87,5	77,7	81,8
6 kg	72,7	100,0	61,5	53,8	75,0	100,0	77,7	90,9
7 kg	81,8	100,0	84,6	77,0	91,7	100,0	100,0	90,9
8 kg	90,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
9 kg	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Sicherheitsschwellen

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
2 kg p_J								0,01
p_A								0,01
3 kg p_J				0,02		0,8	0,02	0,001
p_A				0,02			0,2	0,001
4 kg p_J		0,001	0,05	0,95		0,9	0,001	0,05
p_A			0,001	0,001			0,001	0,05
5 kg p_J		0,001	0,7	0,2		0,001	0,2	0,05
p_A			0,001	0,001			0,1	0,8
6 kg p_J		0,001	0,2	0,01		0,001	0,9	0,01
p_A			0,001	0,001			0,001	0,01
7 kg p_J		0,001	0,8	0,5		0,01	0,01	0,98
p_A			0,001	0,001				0,01
8 kg p_J		0,01	0,01	0,01		0,2	0,2	0,2
p_A								

liegenden Rattenuntersuchungen konnten diese altersbedingten Hautveränderungen weitgehend bestätigen. Es zeigte sich, daß die Rißfestigkeit der Haut bei Ratten mit dem Alter in signifikanter Weise abnimmt, wie es auch WENZEL (1950) bei seinen Untersuchungen an der Haut des Menschen gefunden hat. Nach BÜRGER (1960) ist die Hautelastizität nicht nur vom Alter, sondern auch vom Geschlecht abhängig, und er fand, daß vor allem der Dehnungsrückstand bei der Haut von Frauen geringer war als bei der von Männern gleichen Alters. Die elastischen Elemente scheinen demnach bei Frauen langsamer zu altern als bei Männern. Ähnliches zeigte sich bei den Rattenuntersuchungen, wenn auch nicht beim Dehnungsrückstand, so aber bei der Rißfestigkeit der Haut. Diese lag bei den männlichen Tieren der Gruppe J (jung) signifikant höher als bei den männlichen der Gruppe A (alt). Bei den Weibchen war zwar eine ähnliche Tendenz zu erkennen, doch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Verschiedene Sklerosen und eine Reihe anderer Erkrankungen der menschlichen Haut konnten durch die Zellulartherapie günstig beeinflußt werden (RIETSCHEL, 1957; BRANDNER, 1958). ULLRICH (1958) berichtete auch von günstigen therapeutischen Erfolgen mittels Zellinjektionen bei Hautkrankheiten des Hundes. Eine Unterstützung erfahren diese Berichte durch die besprochenen tierexperimentellen Untersuchungen, bei denen es sich gezeigt hat, daß die Dehnungsfähigkeit der Haut durch die Zellbehandlung im Sinne einer Revitalisierung beeinflußt wurde. Die Rißfestigkeit der Haut blieb durch die Injektion von Placenta- und Testis-Trockenzellen in signifikanter Weise erhöht.

VI. Elastizität der Aorta

(KMENT, A., 1961, KMENT, A., LEIBETSEDER, J., SUMMER, E. 1962; SUMMER, E., 1961)

Einleitung

Das Blutgefäßsystem hat im Rahmen der Bemühungen um die Erforschung der Alterungsvorgänge seit jeher im Vordergrund gestanden. Durch zahlreiche Untersuchungen (LJUNGDAHL, 1915; THOMA, 1921; ASCHOFF, 1939; BÖHMIG, 1943; ROMHANYI, 1955; MAYER,

1951, 1955, 1957, 1958; KARNBAUM, 1957; SIMON und MAYER, 1958) konnte nachgewiesen werden, daß die Gefäße einer Alterswandlung unterliegen, die HEVELKE (1956) als Physiosklerose bezeichnet. Dabei zeigt sich, daß die Wanddicke der Gefäße mit dem Alter zunimmt, was im wesentlichen auf einer Verstärkung der Media und nur in geringem Maß auf einer Verbreiterung der Intima beruht (THOMA, 1921; ASCHOFF, 1939). Die Zunahme der Wanddicke dürfte auch die wesentliche Ursache für die Verminderung der Aortenelastizität im Alter sein. Die Abnahme der Elastizität bedeutet also nicht vorwiegend Verbrauch der elastischen Fasern, sondern mehr eine innere Umstrukturierung, die auf chemischen Vorgängen beruht (BÜRGER und KNOBLAUCH, 1960). Nach LEUTERT (1960) ist die Physiosklerose der Elastika teilweise noch umstritten, vor allem deshalb, weil man im allgemeinen eine Zunahme des mit Elastikafarbstoffen färbbaren Materials feststellen mußte. Man nimmt aber heute an, daß die mit Elastikafarbstoffen darstellbare Substanz ein Degenerationsprodukt des alternden Bindegewebes ist, wie elektronenoptische Untersuchungen von TELLER, VESTER und POHL (1957) ergaben.

Methode

Die zu untersuchenden Ratten wurden durch Genickschlag betäubt und durch Kehlschnitt entblutet. Nach Eröffnung der Brusthöhle wurde die Aorta vom Herz bis zum Zwerchfelldurchtritt sorgfältig freipräpariert und das noch anhaftende Gewebe in Ringerlösung vorsichtig entfernt. Zur Bestimmung der Elastizität verwendeten wir eine von uns dafür entwickelte und erprobte Methode, da die in der Literatur angegebenen Methoden (HARDUNG, 1953; LOWTON, 1955; BADER, 1956; MILLAHN und JASTER, 1960) wegen der Kleinheit der Aortenstücke nicht verwertbar waren. Zur Messung der Elastizität in der Längsrichtung wurde hinter dem Aortenbogen ein 12 mm langes Aortenstück herausgeschnitten und mit einer Schere in der Längsrichtung eröffnet. Für die Elastizitätsbestimmung in der Querrichtung wurde, gleich anschließend, ein 4 mm langes Aortenstück abgeschnitten und ebenfalls in der Längsrichtung eröffnet. Im ersten Fall entstand so ein 12 mm langer und 4–5 mm breiter, im zweiten Fall ein fast quadratischer Aortenstreifen mit einer Seitenlänge von 4–5 mm. Zur Messung der Elastizität wurden die Aortenstücke zwischen zwei Klemmen eingespannt,

von denen die eine an dem Objekttisch eines in Horizontallage gedrehten Mikroskopes befestigt wurde, die andere hing frei vor dem Objektiv und war mit einer kleinen Waagschale verbunden. Beide Klemmen waren seitlich mit einem feinen Metallzeiger versehen. In einer Entfernung von 30 cm vom Objektiv war ein weißer Karton aufgestellt, auf den durch das Mikroskop die Zeiger der beiden Klemmen projiziert werden konnten. Auf dem Karton war die Nullstellung markiert. Zur Bestimmung des Abstandes zwischen den beiden Klemmen, also der Länge des zur Untersuchung gelangenden Aortenstückes, wurde, mit Hilfe der am Objektiv angebrachten Mikrometerschraube, der Objekttisch so weit nach unten oder oben gedreht, bis sich der auf dem Karton projizierte Zeiger der oberen Klemme mit der dort eingezeichneten Marke deckte. In dieser Stellung wurde der Stand der Mikrometerschraube auf 1/10 mm genau abgelesen und notiert. Dann wurde mit der Mikrometerschraube der Objekttisch so weit gehoben, bis sich der Zeiger der unteren Klemme mit der auf dem Karton eingezeichneten Marke deckte, und ebenfalls abgelesen. Die Differenz der beiden abgelesenen Werte ergab dann die genaue Länge des Aortenstückes. Zur Messung der Dehnung, beziehungsweise des Dehnungsrückstandes in der Längsrichtung wurde, nach Bestimmung der Ausgangslänge des Aortenstückes, die Waagschale zunächst mit 5 g belastet und die Dehnung mit Hilfe der Mikrometerschraube gemessen. Dann wurde das Gewicht von der Waagschale entfernt und der Dehnungsrückstand bestimmt. Das gleiche Aortenstück wurde anschließend noch mit 10 g belastet, die dabei auftretende Dehnung und, nach Entlastung, auch der Dehnungsrückstand bestimmt.

Die Bestimmung der Dehnung und des Dehnungsrückstandes in der Querrichtung wurde in der gleichen Weise durchgeführt wie bei der Längsrichtung, nur wurde hier mit 10 g und mit 20 g belastet, da bei kleineren Belastungen die Ausschläge zu gering waren. Das Gewicht der unteren Klemme, zusammen mit der Waagschale, betrug 3,3 g und wurde als Grundbelastung angenommen. Die Belastungs- und Entlastungszeit war jeweils 30 Sekunden. Die Aortenstreifen wurden während der Untersuchung mit Ringerlösung befeuchtet.

Tiermaterial: Wie in Versuch V

Versuchsergebnisse

Elastizität der Aorta in der Längsrichtung

a) Dehnung in % der ursprünglichen Länge (Tabelle 28): Bei allen Tieren war zu beobachten, daß die Dehnungsfähigkeit der Aorta mit zunehmendem Alter abnimmt. Am deutlichsten trat dies bei den männlichen Ratten auf; bei einer Belastung von 10 g war die Verminderung der Dehnungsfähigkeit im Alter signifikant. Eine Wirkung der Trockenzellen konnte nicht festgestellt werden, da sowohl bei einer Belastung von 5 g als auch von 10 g die Dehnungen der Aorten der männlichen Tiere in den Gruppen I und II signifikant geringer waren als die in Gruppe J. Bei den weiblichen Tieren

Tabelle 28

Elastizität der Aorta (Längsrichtung)
Dehnung in % der ursprünglichen Länge

Belastung: 5 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	21,20	17,80	16,12	15,64	18,40	17,67	17,56	17,20
$s_{\bar{x}}$	0,777	1,747	0,934	0,847	1,330	0,823	1,287	0,832
p_J		0,1	0,001	0,001		0,7	0,7	0,5
p_A			0,5	0,6			>0,9	0,7

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	25,50	21,04	19,74	18,53	22,24	20,57	21,95	20,56
$s_{\bar{x}}$	1,058	1,093	0,923	1,073	1,412	1,099	1,467	0,861
p_J		0,01	0,001	0,001		0,4	0,7	0,4
p_A			0,4	0,2			0,8	>0,9

trat wohl eine Verminderung der Dehnung mit dem Alter auf, doch war sie hier nicht signifikant. Ein Einfluß der Behandlung konnte auch bei den Weibchen nicht beobachtet werden.

b) Dehnungsrückstand in % der ursprünglichen Länge (Tabelle 29): Für die Bestimmung des Dehnungsrückstandes ist die Belastung mit 5 g die günstigere. Es zeigte sich hier durchwegs ein geringerer Dehnungsrückstand bei den jungen Ratten. Bei beiden Geschlechtern war die Differenz zwischen den Gruppen J und A ebenfalls gesichert. Durch die Behandlung mit den Substanzen I und II kam es zu einer Verminderung des Dehnungsrückstandes nach der Belastung, so daß eine Signifikanz zwischen den Gruppen J und I bzw. J und II nicht auftrat, und die Differenz zwischen den Gruppen A und II, sowohl bei den männlichen Ratten als auch bei den Weibchen, signifikant wurde.

Tabelle 29

Elastizität der Aorta (Längsrichtung)
Dehnungsrückstand in % der ursprünglichen Länge

Belastung: 5 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	0,44	1,33	0,93	0,80	0,53	1,43	1,20	0,60
$s_{\bar{x}}$	0,153	0,189	0,185	0,144	0,177	0,149	0,353	0,167
p_J		0,01	0,1	0,1		0,001	0,2	0,8
p_A			0,2	0,05			0,6	0,001

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	0,43	0,91	0,71	0,48	0,67	0,52	0,52	0,18
$s_{\bar{x}}$	0,150	0,237	0,214	0,188	0,158	0,149	0,225	0,120
p_J		0,2	0,2	0,9		0,5	0,6	0,05
p_A			0,6	0,2			1	0,1

Bei der Belastung mit 10 g zeigte sich hinsichtlich des Dehnungsrückstandes zwar dieselbe Tendenz, doch kam es zu keinen signifikanten Unterschieden.

c) Dehnungsrückstand in % der Dehnung (Tabelle 30): Bezieht man den Dehnungsrückstand auf die erfolgte Dehnung, so ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie unter b). Es zeigte sich allerdings nur bei den weiblichen Ratten ein signifikanter Effekt. Bei der Belastung mit 5 g war bei den männlichen Tieren auch die Differenz zwischen den Gruppen J und I bzw. II signifikant, während dies bei den weiblichen Tieren nicht der Fall war und hier zusätzlich die Differenz zwischen den Gruppen A und II Signifikanz aufwies.

Tabelle 30

Elastizität der Aorta (Längsrichtung)
Dehnungsrückstand in % der Dehnung

Belastung: 5 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	2,17	7,41	5,77	5,16	2,64	8,37	6,37	3,81
$s_{\bar{x}}$	0,781	0,704	1,211	0,987	0,831	1,014	1,751	1,207
p_J		0,001	0,02	0,05		0,001	0,1	0,5
p_A			0,3	0,1			0,1	0,01

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	1,82	4,35	2,99	2,87	2,98	2,37	2,45	0,94
$s_{\bar{x}}$	0,633	1,037	1,028	1,128	0,714	0,709	0,995	0,630
p_J		0,1	0,4	0,5		0,6	0,7	0,05
p_A			0,4	0,4			0,9	0,2

d) Auftreten eines Dehnungsrückstandes in % (Tabelle 31): Da nicht in allen Fällen ein Dehnungsrückstand auftrat, wurde dieses Merk-

mal auch qualitativ untersucht. Für die verschiedenen Belastungen wurden die Prozentsätze der Tiere, bei welchen ein Dehnungsrückstand zu beobachten war, verwendet. Es ergab sich in allen Fällen ein signifikanter Unterschied zwischen jungen und alten Tieren. Der Behandlungseffekt trat eindeutig hervor, da, mit nur einer Ausnahme (weibliche Tiere, 10 g Belastung, Substanz I), alle Differenzen zwischen der Gruppe A einerseits und den Gruppen I und II andererseits signifikant waren. Daneben blieb die Signi-

Tabelle 31

Elastizität der Aorta (Längsrichtung)
Dehnungsrückstände in %

Belastung: 5 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
%	45,5	100,0	76,9	76,9	50,0	100,0	77,8	54,5

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
%	45,5	83,3	53,8	38,5	66,7	50,0	44,4	18,2

Sicherheitsschwellen

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
5 g p_J		0,001	0,001	0,001		0,001	0,001	0,7
p_A			0,001	0,001			0,001	0,001
10 g p_J		0,001	0,5	0,5		0,05	0,01	0,001
p_A			0,001	0,001			0,7	0,001

fikanz auch zwischen den jungen und den behandelten Tieren teilweise erhalten, das heißt, die Aortenelastizität der behandelten Tiere lag zwischen der der jungen und der alten Ratten.

Elastizität der Aorta in der Querrichtung

a) Dehnung in % der ursprünglichen Länge (Tabelle 32): Das Verhalten der Aorta in der Querrichtung glich dem in der Längsrichtung. Die Dehnungsfähigkeit der jungen Aorten männlicher Ratten war im allgemeinen größer als die der alten Tiere, jedoch nicht signifikant. Signifikanz ergab sich nur bei den männlichen Ratten zwischen den Gruppen J und I bzw. I und II, bei beiden Belastungen. Daraus kann geschlossen werden, daß die Zellinjektionen für das Kriterium a) wirkungslos waren. Bei den weiblichen Tieren traten keinerlei signifikante Unterschiede auf.

Tabelle 32

Elastizität der Aorta (Querrichtung)
Dehnung in % der ursprünglichen Länge

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	48,42	43,73	35,74	31,86	40,03	41,58	34,59	42,35
$s_{\bar{x}}$	1,443	6,738	3,166	4,284	3,505	2,593	2,826	4,111
p_J		0,6	0,01	0,001		0,8	0,3	0,7
p_A			0,3	0,2			0,1	0,9

Belastung: 20 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	62,94	59,29	48,87	45,92	55,93	55,15	53,05	61,16
$s_{\bar{x}}$	2,791	7,775	3,488	5,108	4,584	2,881	4,096	5,024
p_J		0,7	0,01	0,01		0,9	0,7	0,5
p_A			0,3	0,2			0,7	0,4

b) Dehnungsrückstand in % der ursprünglichen Länge (Tabelle 33): Auch hier verhielten sich die Aorten in der Längs- und Querrichtung im wesentlichen gleich. Die geringere Belastung mit 10 g war die günstigere. Allgemein zeigte sich mit zunehmendem Alter eine Zunahme des Dehnungsrückstandes, der bei beiden Geschlechtern signifikant war. Bei den männlichen Ratten wurde diese signifikante Differenz zwischen jungen und alten Ratten sowohl durch Substanz I als auch Substanz II aufgehoben, was für eine Wirkung der Zellinjektionen spricht.

Bei der Belastung mit 20 g war der Dehnungsrückstand bei den männlichen Tieren der Gruppen A, I und II signifikant größer als in der Gruppe J. Bei den Weibchen war keine Signifikanz zu beobachten.

Tabelle 33

Elastizität der Aorta (Querrichtung)
Dehnungsrückstand in % der ursprünglichen Länge

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	3,08	5,30	4,13	3,65	1,32	6,99	4,93	4,65
$s_{\bar{x}}$	0,654	0,803	1,021	0,931	0,595	0,747	1,048	1,065
p_J		0,05	0,4	0,7		0,001	0,01	0,2
p_A			0,4	0,2			0,2	0,1

Belastung: 20 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	1,62	4,78	3,36	4,00	3,10	3,06	3,74	4,35
$s_{\bar{x}}$	0,564	1,092	0,618	0,688	0,870	0,662	1,252	0,876
p_J		0,05	0,05	0,02		0,9	0,7	0,4
p_A			0,3	0,6			0,4	0,3

c) Dehnungsrückstand in % der Dehnung (Tabelle 34): Bezieht man den Dehnungsrückstand auf die erfolgte Dehnung, so ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie unter b), nur, daß bei der Belastung mit 10 g die weiblichen Ratten der Gruppe II zwischen den Gruppen J und A liegen, so daß gegenüber beiden Gruppen eine signifikante Differenz auftrat. Diese Verschiebung der Elastizität in Richtung der jüngeren Ratten darf als eine Wirkung der Siccacell-Verabreichung gedeutet werden.

Tabelle 34

Elastizität der Aorta (Querrichtung)
Dehnungsrückstand in % der Dehnung

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	6,30	12,08	11,32	11,31	3,96	17,20	14,06	10,75
$s_{\bar{x}}$	1,366	1,093	2,477	2,401	1,911	1,899	2,093	2,066
p_J		0,001	0,1	0,1		0,001	0,01	0,05
p_A			0,8	0,8			0,3	0,05

Belastung: 20 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
$\bar{x}$	2,66	7,38	7,22	8,05	5,01	5,65	7,12	7,20
$s_{\bar{x}}$	0,957	1,791	1,398	1,255	0,839	1,244	2,489	1,380
p_J		0,05	0,02	0,01		0,7	0,5	0,2
p_A			0,9	0,8			0,7	0,5

d) Auftreten eines Dehnungsrückstandes in % (Tabelle 35): Bei den männlichen Ratten trat die Altersabhängigkeit dieses Merkmals, sowohl bei der 10-g- als auch bei der 20-g-Belastung, mit Signifikanz in Erscheinung. Die Wirkung der Zellinjektionen zeigte sich

bei der geringeren Belastung in signifikanter Form, während sie bei der 20-g-Belastung nicht nachweisbar war. Bei den weiblichen Ratten war nur die 10-g-Belastung verwertbar; hier trat der Dehnungsrückstand bei den alten Tieren signifikant häufiger als bei den jungen auf. Eine signifikante Verminderung dieser Häufigkeit wurde lediglich durch die Substanz II bewirkt. Das Gewicht von 20 g ergab bei den Weibchen einen ziemlich gleich häufigen Dehnungsrückstand – es scheint für die Eruierung der feinen Unterschiede ungeeignet zu sein.

Tabelle 35

Elastizität der Aorta (Querrichtung)
Dehnungsrückstand in %

Belastung: 10 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
%	72,7	100,0	69,2	30,8	33,3	100,0	100,0	81,8

Belastung: 20 g

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
n	11	6	13	13	12	16	9	11
%	45,5	83,3	76,9	92,3	66,7	68,8	66,7	81,8

Sicherheitsschwellen

Geschl.	männlich				weiblich			
Gruppe	J	A	I	II	J	A	I	II
10 g p_J		0,001	0,7	0,001		0,001	0,001	0,001
p_A			0,001	0,001				0,001
20 g p_J		0,001	0.001	0,001		0,9		0,05
p_A			0,5	0,1			0,9	0,05

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Ratten lassen eine deutliche Altersabhängigkeit der Aorten-Elastizität erkennen. Besonders bei den Männchen nahm die Dehnungsfähigkeit der Aorta mit dem Alter signifikant ab; auch der Dehnungsrückstand war bei den alten Tieren deutlich größer als bei den jungen.

Die meist im Alter auftretende Arteriosklerose kann sich um so leichter entwickeln, je fortgeschrittener die Physiosklerose ist (HEVELKE, 1960), da die zur Entwicklung der Arteriosklerose führenden Noxen eine biochemisch und strukturell veränderte Arterienwand antreffen. Die Arteriosklerose kann, nach Berichten von AHRENS und KUNKE (1949), KUHN und KNÜCHEL (1954), KUHN (1956) und RIETSCHEL (1957), durch die Injizierung von Zellmaterial günstig beeinflußt werden. Diese Beobachtungen erfahren eine Unterstützung durch das Auftreten eines Revitalisierungseffektes, wie er in den hier dargelegten tierexperimentellen Untersuchungen festzustellen war. Dieser Effekt äußerte sich bei den Ratten nach Zellinjektionen durch Beeinflußbarkeit der Aortenelastizität in der Weise, daß zwar die Dehnungsfähigkeit der Aorta nicht verändert wurde, daß aber sehr wohl der Dehnungsrückstand, sowohl durch Placenta- als auch durch Testis-Trockenzellen, bei beiden Rattengeschlechtern zu beeinflussen war. Gerade der Dehnungsrückstand muß aber als wichtiges Kriterium der Elastizität angesehen werden, da ein Körper um so günstigere elastische Verhältnisse zeigt, je mehr er nach Aufhören der formverändernden Kraft seine ursprüngliche Gestalt wieder annimmt. Die Tatsache, daß die Dehnungsrückstände in den Gruppen J (jung), I (Placenta) und II (Testis) wesentlich kleiner waren als die in der Kontrollgruppe A (alt), weist in die Richtung, daß durch die Zellinjektionen der Alterungsprozeß der Aorten zwar nicht aufgehoben, aber doch verlangsamt werden konnte.

VII. Kollagenuntersuchungen

(KMENT, A., 1960; KMENT, A., LEIBETSEDER, J., STEININGER, K., 1961; LEIBETSEDER, J., STEININGER, K., 1960)

Einleitung

Veränderungen des Bindegewebes sind aus zwei Gründen von großer Bedeutung: erstens ist Bindegewebe fast in jedem Organ anzutreffen, und zweitens geht eine Reihe von Krankheiten und Leiden vom Bindegewebe aus oder steht in engstem Zusammenhang damit. Da gerade die sogenannten Alterskrankheiten, wie chronischer Rheumatismus, Arthritiden, zahlreiche Hautveränderungen und die Sklerose das Bindegewebe betreffen, bekam dieses in der Gerontologie und Geriatrie zunehmende Bedeutung. Ein großer Teil der histologischen Untersuchungen und der experimentellen Forschung gilt dem Hauptbestandteil des Bindegewebes, dem Kollagen. Mit verschiedenen Untersuchungsmethoden (Wärmeverkürzung, VERZÁR, 1956; Änderung der Schrumpfungstemperatur mit dem Alter, BROWN und CONSDEN, 1958; Säurequellung, BANGA und SCHÖNFELDER, 1956) konnte man den Einfluß des Alters auf das Kollagen nachweisen. Wesentlich dabei ist, daß die Kollagenfasern mit zunehmendem Alter starrer werden, was durch die Vermehrung von Querverbindungen, wahrscheinlich von H-Brücken, zwischen den Fadenmolekülen zustande kommen dürfte.

Bei den oben erwähnten Alterskrankheiten konnte die Zellulartherapie öfters mit gutem Erfolg angewendet werden (RIETSCHEL, 1957). Alle diese Tatsachen waren Veranlassung, festzustellen, ob sich experimentell eine Beeinflussung des Kollagens durch die Verabreichung von Trockenzellen nachweisen läßt.

Methode

Die vorliegende Methode wurde gewählt, weil die Sehnenfäden des Rattenschwanzes fast zur Gänze aus Kollagen bestehen, und ihre Wärmekontraktion außerdem sehr gut die Altersveränderungen des Kollagens anzeigt, da mit dem Alter die Verkürzung der Sehnenfäden zunimmt (VERZÁR, 1956).

Aus dem Schwanz der für die Versuche getöteten Ratten wurden Sehnenfäden in folgender Weise präpariert: nach einem Kreis-

schnitt am Schwanzansatz und einem Längsschnitt entlang des ganzen Schwanzes wurde die Haut abgezogen, hierauf an der Schwanzspitze ein dickeres Bündel von Sehnenfäden mittels einer Pinzette isoliert und gegen den Schwanzansatz zu abgehoben. In einer Länge von 12 cm wurde das Sehnenfädenbündel vom Schwanz abgetrennt und durch Ausziehen einzelner Sehnenfäden auf ein Gewicht von 30 mg gebracht. Von jedem Tier wurden zwei derartige Sehnenfäden präpariert und mit 100 bzw. 200 mg belastet, hierauf in eine Ringerlösung von 58° C gehängt, in die ein Gasgemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 eingeleitet wurde. Die maximale Verkürzung der Sehnenfäden wurde mit Hilfe eines Millimeter-Rasters aus Glas, der unmittelbar hinter den hängenden Sehnenfäden angebracht war, bestimmt und in Prozenten der ursprünglichen Länge angegeben.

Tiermaterial (siehe IIa, Seite 409)

Für die Untersuchungen standen 63 Laboratoriumsratten in drei Gruppen zur Verfügung. Das Alter der Tiere war zu Versuchsbeginn 1 Jahr.

Gruppe K = unbehandelte Kontrollgruppe (19 Ratten)
Gruppe P = behandelt mit Placenta-Trockenzellen (20 Ratten)
Gruppe T = behandelt mit Testis-Trockenzellen (24 Ratten)

Ergebnisse

Die maximale Verkürzung der Sehnenfäden war nach längstens 10 Minuten erreicht. Die Verkürzung war bei der Belastung mit 200 mg etwas geringer, die Verhältnisse zwischen den einzelnen Gruppen aber waren bei beiden Belastungen annähernd die gleichen. Die Werte sind aus Tabelle 36 zu ersehen und graphisch in den Abbildungen 141 und 142 dargestellt. Die Untersuchung der Differenzen auf Signifikanz erfolgte wieder mit dem t-Test nach STUDENT. Die Verkürzung der Sehnenfäden war, wie aus Tabelle 36 hervorgeht, in beiden behandelten Gruppen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, wobei die Signifikanz in der Gruppe Placenta höher lag als in der Gruppe Testis. Auch bei diesem Versuch wurde die Aufgliederung nach Geschlecht vorgenommen. Dabei stellte sich heraus (Tabelle 37, Abbildungen 142 und 143), daß auf Placenta-Trockenzellen männliche und weibliche Tiere gleich ansprachen;

Tabelle 36
Verkürzung der Sehnenfäden in %

Gr.	Tier-zahl	100 mg Belastung			200 mg Belastung		
		$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	p	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	p
K	20	63,8	0,927		62,3	1,083	
P	19	47,4	2,915	0,001	40,8	3,989	$< 0{,}001$
T	24	59,5	1,434	0,05	57,1	1,442	$< 0{,}01$

die Verkürzung war bei beiden Geschlechtern, gegenüber den Kontrolltieren, signifikant vermindert. Auf die verabreichten Testis-Trockenzellen reagierten nur die männlichen Tiere. Die Differenz der Verkürzung zwischen weiblichen Kontrolltieren und weiblichen Tieren der Gruppe Testis war nicht signifikant.

Unter Verwendung der Ergebnisse von VERZÁR (1956) wurde die Abhängigkeit der Verkürzung der Sehnenfäden vom Alter graphisch dargestellt und auf der Kurve der jeweils gefundene Wert für die Kontroll-, Testis- und Placentagruppen (Belastung 200 mg) eingezeichnet. Da die Einzelwerte der Untersuchung von VERZÁR nicht zur Verfügung standen, mußte auf eine statistische Auswertung seiner Beobachtungen verzichtet werden, so daß eine eventuell mögliche Regressionsgerade nicht aufgestellt werden konnte. Außerdem führte VERZÁR seine Untersuchung wohl mit der gleichen Methode, jedoch mit einer Belastung von 200 mg durch, so daß die vorliegenden 100 mg-Werte zu seinen Befunden nicht in Beziehung gebracht, sondern nur die 200 mg-Ergebnisse mit seinen Experimenten verglichen werden konnten. Aber auch so zeigt die Abbildung 144 deutlich, daß bei den mit Trockenzellen (Placenta, Testis) behandelten Ratten ein Kollagenverkürzungsgrad festzustellen ist, der einem jüngeren Lebensalter entspricht.

Diskussion

Ein wesentlicher Bestandteil des Bindegewebes der Haut ist das Kollagen, dessen Altersveränderungen gut bekannt sind. Die geänderte Reaktionsweise des Kollagens hängt vielfach eng mit dem Gehalt an Oxyprolin zusammen, das imstande ist, Wasserstoffbin-

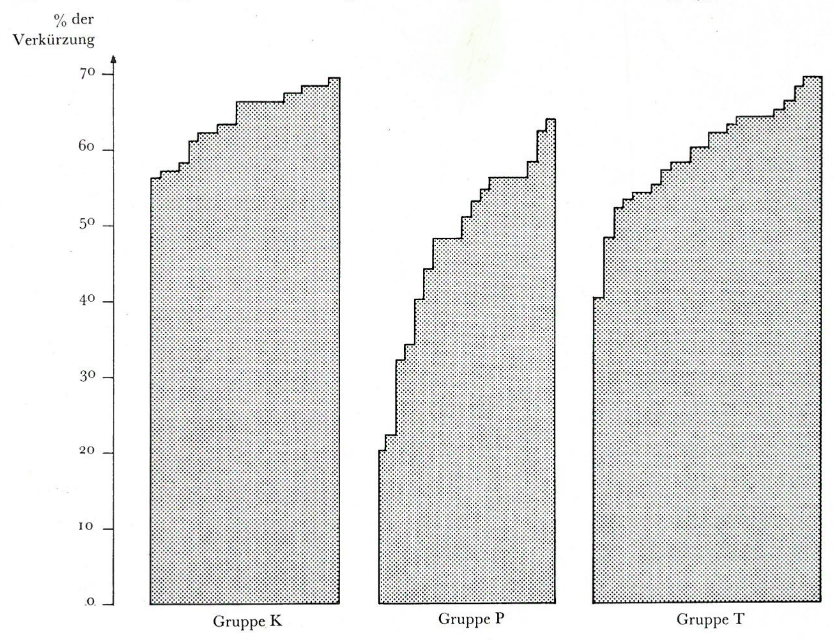


Abbildung 140

Verkürzung der kollagenen Fasern (Belastung: 0,1 g)

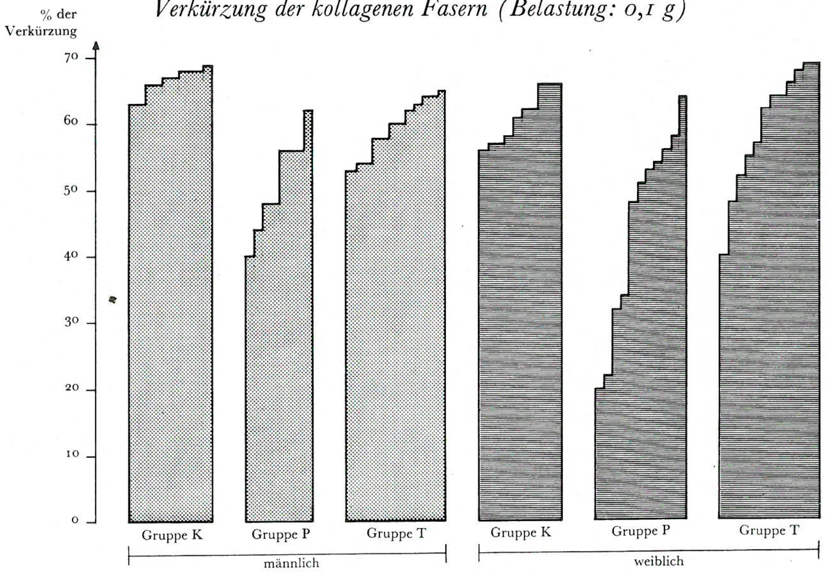


Abbildung 142

Verkürzung der kollagenen Fasern (Belastung: 0,1 g)

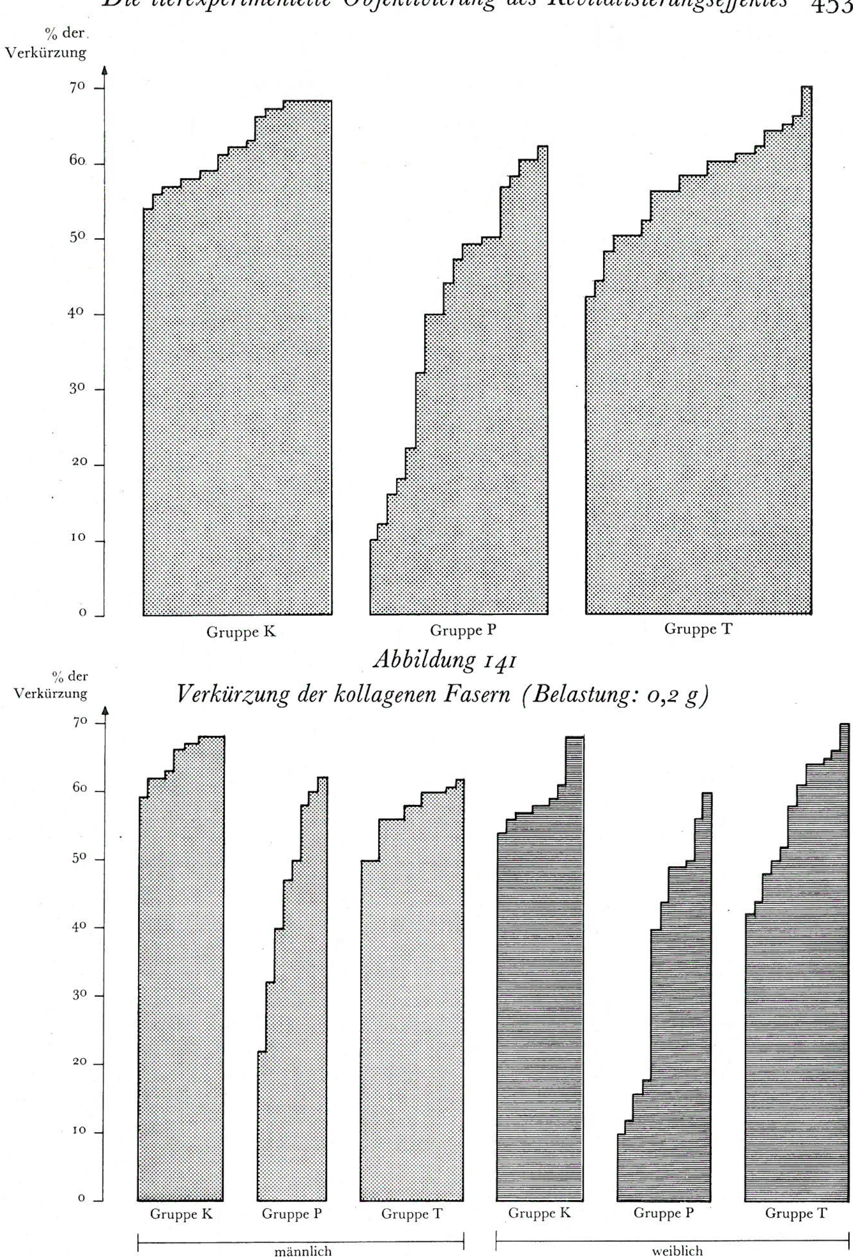


Abbildung 141

Verkürzung der kollagenen Fasern (Belastung: 0,2 g)

Abbildung 143

Verkürzung der kollagenen Fasern (Belastung: 0,2 g)

Tabelle 37
Verkürzung der Sehnenfäden in % (Geschlechtsberücksichtigung)

Gr.	Tierzahl		$\bar{x}$		$s_{\bar{x}}$		p	
	m.	w.	m.	w.	m.	w.	m.	w.
			100 mg Belastung					
K	10	10	66,5	61,1	0,654	1,260		
P	8	11	51,3	44,7	2,480	4,555	< 0,001	< 0,01
T	12	12	59,6	59,5	1,228	2,664	< 0,001	< 0,6
			200 mg Belastung					
K	10	10	65,0	59,6	1,022	1,514		
P	8	11	46,5	36,7	4,985	5,688	< 0,01	< 0,01
T	12	12	57,3	57,0	1,135	2,722	< 0,001	< 0,5

dungen einzugehen (GUSTAVSON, 1954). VERZÁR (1956) nimmt an, daß die Möglichkeit der Umwandlung des Kollagens in Elastin besteht, was sich sowohl durch das Verhalten bei der Thermokontraktion der Rattenschwanzsehnenbündel als auch durch die mikroskopischen Befunde erhärten läßt. Auf Grund der hier beschriebenen Untersuchungen ist anzunehmen, daß der Stoffwechsel des

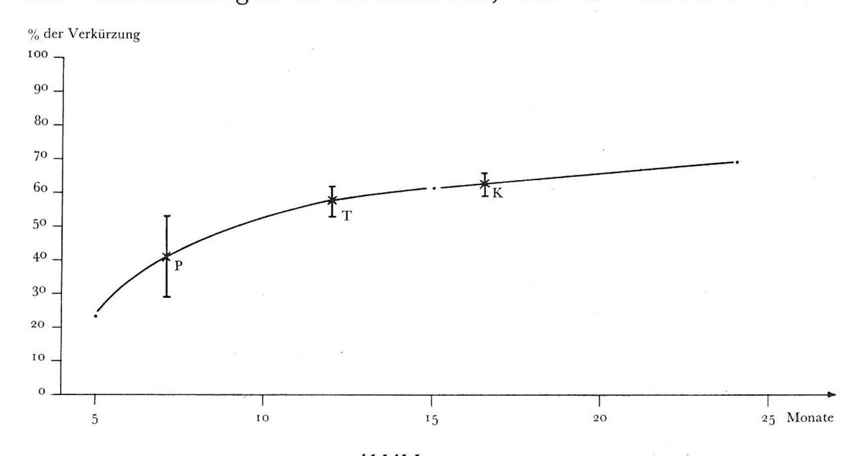


Abbildung 144
Die Kollagenverkürzung in verschiedenen Lebensaltern (Verzár) und die Wirkung der Siccacell-Behandlung

Kollagens durch die Trockenzellen in der Richtung beeinflußt wurde, daß es zu einer geringeren Ausbildung von H-Brücken am Oxyprolin kommt. Die daraus resultierende signifikant geringere Verkürzung der Sehnenfäden darf als ein Teil des Revitalisierungseffektes nach Zellinjektionen angesehen werden. Aus diesen Untersuchungen dürfte auch der Hinweis darauf entnommen werden, daß das Geschlecht des Zellempfängers vielleicht einen Einfluß auf den Eintritt des Revitalisierungseffektes hat.

VIII. Thyreoidea und J¹³¹-Aufnahme

Einleitung

Klein (1957) berichtet, daß mit zunehmendem Alter folgende Befunde über die Schilddrüsenfunktion zu erheben sind: es sinkt der Grundumsatz, der Hormonjodgehalt des Blutes bleibt im Bereich der Norm, das anorganische Blutjod steigt an und die Schilddrüse wird jodarm. Perlmutter und Riggs (1946) stellten fest, daß bei Männern mit zunehmendem Alter ein kontinuierlicher, bei Frauen mit dem Klimakterium ein plötzlicher Verlust der Jodspeicherfähigkeit der Schilddrüse einsetzt. Bürger und Möbius (1934) konnten einen statistisch gesicherten Anstieg des Gesamtblutjods im Alter nachweisen. Diese Angaben werden von Klein (1951) bestätigt, andererseits herrscht bei einigen Autoren (Rapport, 1950; Bloch-Michel, 1953) die Meinung vor, daß keine besonderen Zusammenhänge zwischen dem Jodstoffwechsel und dem Altern bestehen. Die nachfolgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob durch die Trockenzellenverabreichung eine Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion zu beobachten ist.

Methode

Die Aktivität der Schilddrüsen wurde mit Hilfe von radioaktivem Jod ^{131} bestimmt. Es wurde den Ratten trägerfreies Jod ^{131} in einer Dosierung von 20 μ C in einem Milliliter pro Tier i. p. verabreicht. Als Kriterien der Schilddrüsenfunktion dienten:

1. Der 24-Stunden-Speichertest, der in Form einer In-vivo-Messung und einer Aktivitätsmessung der hydrolysierten Thyreoidea durchgeführt wurde,
2. Die Konzentration an Gesamtplasmajod^{131} (TPI^{131}),

3. Die Konzentration an proteingebundenem Plasmajod^{131} (PBI^{131}),
4. Die 24-Stunden-Umwandlungsrate (Conversion ratio).

ad 1. Zur In-vivo-Messung wurden die Tiere mit Äther narkotisiert, die Aktivität der Schilddrüsen wurde 11 cm über der Schilddrüsengegend, nach Abschirmung des übrigen Tierkörpers mit 3 cm starken Bleiplatten, gemessen. Anschließend wurden die Schilddrüsen freipräpariert, von anhaftendem Gewebe befreit, mit 2 ml n NaOH hydrolisiert und die Aktivität des Hydrolysates gemessen.

ad 2. Das Blut wurde in mit 0,2 ml «Heparin novo» beschickten Standgefäßen aufgefangen, die Menge festgestellt und anschließend durch 15 Minuten bei 1500 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die Konzentration an Gesamtplasmajod^{131} wurde durch Messung von 2 ml Plasma und Umrechnung auf 1 ml ermittelt.

ad 3. Die Plasmaproteine und damit das PBI^{131} wurden mit 20prozentiger Trichloressigsäure gefällt. Der Niederschlag wurde dreimal mit 0,1prozentiger Kaliumjodidlösung gewaschen und zentrifugiert. Das so gereinigte Präzipitat wurde auf seinen Gehalt an Jod^{131} untersucht.

ad 4. Das PBI^{131} wurde zum Gesamtplasmajod^{131} durch Bildung der Umwandlungsrate und zwar $\frac{PBI^{131} \times 100}{TPI^{131}}$ in Beziehung gesetzt.

Alle Radioisotopenmessungen (mit Ausnahme der In-vivo-Messungen) erfolgten in einer Bleikammer über 2 Minuten. Registriert wurde mittels eines Szintillationszählers der Type FH 451 und eines Strahlungsmeßgerätes FH 49 (Frieseke und Höpfner). Die erhaltenen Impulswerte wurden nach Abzug des NZ (background) mit Hilfe eines Caesium-Standards korrigiert. Zum Vergleich wurde eine 1:100 verdünnte Lösung der verabreichten J^{131}-Menge gemessen und alle Messungen wurden auf diesen Wert bezogen. Alle Angaben verstehen sich daher in Prozenten der verabreichten Dosis J^{131}.

Tiermaterial: Wie in Versuch VII

Ergebnisse

Wie aus Tabelle 38 zu ersehen ist, liegen die Werte der Schilddrüsenaktivität, und zwar bei allen 3 Gruppen, bei den In-vivo-Mes-

sungen um etwa 15,6–22 % höher als die Werte des Schilddrüsen-Hydrolysates. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem t-Test nach Student und ergab, daß nur zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe Testis, und zwar nur bei der Umwandlungsrate, ein statistisch gesicherter Unterschied in Richtung einer Hypothyreose festgestellt werden konnte. Wenn wir die Ergebnisse aber unter Berücksichtigung des Geschlechts betrachten (Tabelle 39), zeigt sich, daß bei den weiblichen Ratten der Gruppen Placenta und Testis eine leichte Verschiebung in Richtung einer Hypothyreose festzustellen ist. Dieser signifikante Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ergibt sich bei der Gruppe Placenta nur bei der Umwandlungsrate, während er sich bei der Gruppe Testis sowohl bei der In-vivo-Messung, beim Hydrolysat als auch bei der Umwandlungsrate nachweisen läßt. Bei den männlichen Ratten konnte zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Versuchsgruppen kein Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 38

J^{131}-Menge in % der verabreichten Dosis

Gruppe		K	P	T
Tierzahl		19	19	21
Thyreoidea	$\bar{x}$	49,59	47,49	45,50
in vivo	$s_{\bar{x}}$	2,25	3,07	3,05
	p		$<0,6$	$<0,3$
Thyreoidea	$\bar{x}$	39,21	40,07	38,04
Hydrolysat	$s_{\bar{x}}$	1,74	2,51	2,33
	p		$<0,8$	$<0,7$
TPI^{131}	$\bar{x}$	0,127	0,161	0,105
pro ml	$s_{\bar{x}}$	0,014	0,021	0,014
	p		$<0,2$	$<0,3$
PBI^{131}	$\bar{x}$	0,081	0,092	0,059
pro ml	$s_{\bar{x}}$	0,010	0,012	0,009
	p		$<0,5$	$<0,1$
Conversion	$\bar{x}$	62,63	57,14	52,07
Ratio	$s_{\bar{x}}$	1,81	2,37	3,35
	p		$<0,1$	$<0,01$

Tabelle 39

J^{131}-Menge in % der verabreichten Dosis (nach Geschlechtern)

Gruppe	K		P		T	
	m.	w.	m.	w.	m.	w.
Tierzahl	9	10	8	11	11	10
	Thyreoidea in vivo					
$\bar{x}$	43,95	54,67	46,65	48,11	51,15	39,29
$s_{\bar{x}}$	3,40	1,99	5,15	3,96	4,45	3,31
p			< 0,7	< 0,2	< 0,3	< 0,001
	Thyreoidea Hydrolysat					
$\bar{x}$	35,51	42,55	40,70	39,61	41,64	34,08
$s_{\bar{x}}$	2,75	1,67	4,21	3,25	3,37	2,97
p			< 0,4	< 0,5	< 0,2	< 0,05
	TPI^{131} pro ml					
$\bar{x}$	0,121	0,133	0,150	0,168	0,105	0,106
$s_{\bar{x}}$	0,018	0,023	0,032	0,029	0,019	0,022
p			< 0,5	< 0,4	< 0,6	< 0,5
	PBI^{131} pro ml					
$\bar{x}$	0,073	0,088	0,087	0,095	0,062	0,056
$s_{\bar{x}}$	0,013	0,015	0,019	0,016	0,012	0,015
p			< 0,6	< 0,8	< 0,6	< 0,2
	Conversion Ratio					
$\bar{x}$	58,29	66,54	57,46	56,90	56,78	46,87
$s_{\bar{x}}$	2,46	2,01	4,19	2,93	4,65	4,51
p			< 0,9	< 0,02	< 0,8	< 0,001

Die Untersuchungen der Schilddrüsenfunktion nach Injizierung von Zellmaterial haben keine eindeutigen objektiven Beweise eines Revitalisierungseffektes erbracht. Die Schwierigkeit scheint darin zu liegen, daß keine so strenge Gesetzmäßigkeit zwischen Alter und Schilddrüsenfunktion wie bei der Zellatmung und der Kollagen-Alterung besteht.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen der Schilddrüsenfunktion nach Verabreichung von Trockenzellen stehen in gewissem Einklang mit den Ergebnissen von QUIMBY (1950) bei Männern und Frauen. Dieser Autor fand, daß der 24-Stunden-Uptake sich ständig, aber nur ganz gering, mit jeder Dekade verminderte, und die Werte der Frauen lagen, in allen Lebensaltersgruppen, etwas höher als die der Männer. Auch bei den hier mitgeteilten Tierexperimenten zeigte es sich, daß in der Kontrollgruppe die Werte der weiblichen Tiere etwas höher als die der männlichen waren. VERZÁR und FREYDBERG (1956) untersuchten die Funktion der Schilddrüse alter (20–29 Monate) und junger (7–9 Monate) Ratten. Auch mit diesen Werten stimmen die Ergebnisse des 24-Stunden-Uptake gut überein. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestand nicht. Auch VERZÁR fand in den ersten vier Tagen keine Differenzen zwischen alten und jungen Tieren, wies aber, ab dem 5. Tag nach der Injektion, bei den alten Ratten eine etwas geringere Jodabgabe der Schilddrüse als bei den jüngeren Tieren nach. Aus versuchstechnischen Gründen konnten die vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht über einen so langen Zeitraum durchgeführt werden. Eine signifikante Verminderung des TPI und PBI mit dem Alter, so wie sie von TUCKER und KEYS (1951) beim Mann festgestellt wurde, ist bei den verwendeten Ratten nicht zu beobachten gewesen.

In der Gesamtheit betrachtet, zeigte sich bei den Versuchstieren nur eine signifikante Verminderung der Conversion ratio bei der Gruppe Testis gegenüber der Kontrollgruppe. Es darf diese Verminderung aber nicht als eine Hypothyreose gedeutet werden, da nach WERNER (1957) viele Euthyreotiker eine sehr niedrige Conversion ratio aufweisen. Diese hat daher nur Bedeutung für die Unterscheidung von Eu- und Hyperthyreose erlangt. Eine bindende Interpretation dieser Ergebnisse kann nicht gegeben werden, da zur Behandlung von Schilddrüsenleiden bisher hauptsächlich Schilddrüsenzellen verwendet wurden, die bei Hypothyreosen einen sehr wechselnden Erfolg zeitigten (STURM, 1955; RIETSCHEL, 1957).

IX. Gewebeatmung

Kment, A., 1960; Kment, A., 1961; Kment, A., Leibetseder, J., Steininger, K., 1961; Leibetseder, J., Steininger, K., 1960)

Einleitung

Die Atmung gehört zu den Grundprozessen des Lebens. Das Leben jedes Ein- oder Mehrzellers ist an die ständige Bereitstellung freier Energie gebunden. Diese Energie gewinnt die Zelle, und zwar jede Zelle für sich, aus bestimmten Energieträgern im Verlauf der sogenannten Gewebeatmung, die in der Umwandlung energiereicher Stoffe zu energiearmen Schlacken während der biologischen Oxydation besteht. Ein sehr wesentliches Merkmal der lebenden Substanz ist, daß sie in engster Beziehung zur Zeit steht. Die Zeit ist unlösbar mit dem Lebensgeschehen verbunden und manifestiert sich am sichtbarsten in periodischen Veränderungen, in Rhythmen und den phasenhaften Umgestaltungen der lebenden Substanz. In jüngster Zeit fanden die Energieumsetzungen im Zusammenhang mit dem Lebensalter zunehmendes Interesse. Es ist allgemein bekannt, daß mit dem Altern die Leistungen des Organismus abnehmen. Die Assimilation in der Jugend kommt in den adulten Organismen über längere Zeit in einen Gleichgewichtszustand mit der Dissimilation, die dann im Alter schließlich überwiegt. Dieses Verhalten des Gesamtorganismus ist schicksalhaft; die Frage aber, wie es zur Änderung der Leistungsfähigkeit kommt, ist noch ungeklärt.

Nach den derzeitigen klinischen Erfahrungen und Testen dürfte die somatische Komponente des Revitalisierungseffektes bei der Zellulartherapie durch eine Zellstoffwechselaktivierung zustandekommen. Die vorliegenden Untersuchungen sollten klären helfen, ob sich der Alterungsprozeß im Stoffwechsel der einzelnen Zelle widerspiegelt, und ob der Zellstoffwechsel durch die parenterale Verabreichung von Zellmaterial eine quantitative Änderung erfährt, die als objektiver Ausdruck einer Revitalisierung angesehen werden kann. Die erste Frage war das Thema eines Vorversuches, während die zweite im Hauptversuch bearbeitet wurde. Als Kriterium der Zellstoffwechselaktivität diente die Spontanatmung von Gewebehomogenaten (Herz, Leber, Niere, Aorta).

Methode

Die Zellatmung von Herz, Leber und Niere wurde mit Hilfe der direkten Methode im Warburg-Apparat bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten immer am Vormittag. Die seit 24 Stunden nüchternen Ratten wurden mit Äther narkotisiert, durch Kehlschnitt entblutet, hierauf wurden Brust- und Bauchhöhle eröffnet, das Herz, ein etwa bohnengroßes Stück des rechten Leberlappens und die linke Niere exenteriert, anhaftendes Gewebe, Herzbeutel sowie Nierenkapsel entfernt, die Vorhöfe und Herzkammern wurden eröffnet und eventuell vorhandene Blutkoagula herausgenommen. Die Organe, beziehungsweise Organstücke, wurden in 10 ml ungepufferter Krebs-Ringerlösung mit einem Ultra-Turax-Homogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Die Warburg-Kölbchen, in deren zentrale Zylinder je 0,2 ml 10prozentiger KOH einpipettiert wurden, um das bei der Atmung freiwerdende CO_2 zu binden, wurden mit 2 ml Homogenat beschickt. Vom Zeitpunkt der Tötung bis zum Beginn der Untersuchung im Warburg-Apparat verging ungefähr eine halbe Stunde. Bei einer Temperatur von $37{,}5 \pm 0{,}01°$ C wurde während einer Stunde der O_2-Verbrauch der Homogenate in Luft festgestellt, wobei die Manometer in Intervallen von 10 Minuten abgelesen wurden. Der Rüttelausschlag betrug 5 cm, die Rüttelfrequenz 100/Minute. Um die Fehlerquellen, die bei der Bestimmung des Feucht- oder Trockengewichtes von Organen auftreten, auszuschalten, wurde der O_2-Verbrauch nicht auf Feucht- oder Trockengewicht, sondern auf den Stickstoffgehalt der Homogenate, der mit einer Mikro-Kjeldahl-Apparatur bestimmt wurde, bezogen. Der so ermittelte Quotient Q_{O_2} (N) gibt den O_2-Verbrauch in Mikrolitern pro mg Stickstoff in atmosphärischer Luft nach einer Stunde an.

Im Hauptversuch wurde für die Bestimmung der Herz-, Leber- und Nieren-Homogenate die gleiche Methode nach Warburg wie im Vorversuch angewendet, nur betrugen die Intervalle zwischen zwei Manometerablesungen 15 Minuten, und die Zeit der untersuchten Spontanatmung wurde auf 2 Stunden ausgedehnt, wobei der Quotient für eine und zwei Stunden angegeben wurde.

Die Bestimmung der Spontanatmung der Aorta wurde ebenfalls mit Hilfe der direkten Methode im Warburg-Apparat durchgeführt. Nach der Tötung wurde die Brusthöhle der Tiere eröffnet, die

Aorta thoracica herausgenommen und das anhaftende Bindegewebe entfernt. Die Aorten wurden sodann durch Spülen mit Krebs-Ringerlösung sorgfältig von Blutresten befreit. Im übrigen wurde die Methode der obigen Untersuchungen beibehalten, nur statt des Ultra-Turax-Homogenisators der Potter-Elvehjem-Glashomogenisator verwendet.

Tiermaterial (siehe II a, Seite 409)

Der *Vorversuch* wurde mit 30 Ratten beiderlei Geschlechts in drei gleich großen Gruppen durchgeführt. Die Tiere der 1. Gruppe waren ein halbes Jahr, die der 2. Gruppe ein Jahr und die der 3. Gruppe zwei Jahre alt.

Für den *Hauptversuch* (Herz, Leber, Niere) standen insgesamt 63 Laboratoriumsratten in 3 Gruppen zur Verfügung. Das Alter der Tiere war zu Beginn 1 Jahr.

Gruppe K: unbehandelte Kontrollgruppe (20 Ratten),
Gruppe P: behandelt mit Placenta-Trockenzellen (19 Ratten),
Gruppe T: behandelt mit Testis-Trockenzellen (24 Ratten).

Für den *Ergänzungsversuch* (Aorta) waren insgesamt 60 männliche Ratten vorhanden. Das Tierkollektiv bestand aus folgenden fünf Gruppen:

Gruppe I, II und III: je 12 halbjährige (Gr. I), einjährige (Gr. II) und zweijährige (Gr. III) Ratten,
Gruppe IV: behandelt mit Placenta-Trockenzellen (zu Versuchsbeginn 1 Jahr alt, 11 Ratten),
Gruppe V: behandelt mit Testis-Trockenzellen (zu Versuchsbeginn 1 Jahr alt, 13 Ratten).

Versuchsergebnisse

a) Vorversuch (Herz, Leber, Niere)

In Abbildung 145 sind die Einzelwerte und die daraus errechneten Durchschnitte der 3 Gruppen gegenübergestellt. Hieraus geht deutlich hervor, daß die einzelnen Homogenate einen stark voneinander verschiedenen O_2-Verbrauch haben. Die Werte der Nierenhomogenate liegen, grob ausgedrückt, doppelt so hoch und die der Leberhomogenate fast dreimal so hoch wie die der Herzhomogenate. Wei-

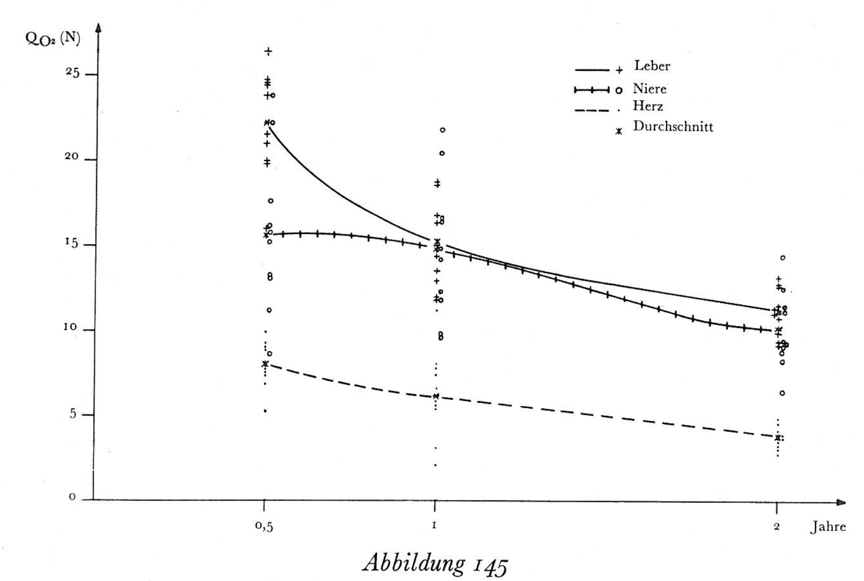


Abbildung 145

Abhängigkeit der Zellatmung vom Lebensalter

ter zeigt die Abbildung, daß der O_2-Verbrauch der Homogenate mit zunehmendem Lebensalter abnimmt. Aus der Tabelle 40 ist die Abnahme der Atmung aus den Mittelwerten und den dazu gehörigen prozentualen Angaben zu ersehen.

Zur weiteren Auswertung der Ergebnisse war es notwendig, statistische Methoden heranzuziehen. Es lag nahe, anzunehmen, daß eine Beziehung zwischen dem Ausmaß der Zellatmung und dem Alter besteht. Mit Hilfe der Varianzanalyse wurde geprüft, ob die

Tabelle 40

Lebensalter und Zellatmung

Alter Jahre	Tierzahl	Herz		Leber		Niere	
		Q_{O_2}(N)	%	Q_{O_2}(N)	%	Q_{O_2}(N)	%
0,5	10	8,083	100,0	22,279	100,0	15,702	100,0
1	10	6,168	76,3	15,010	67,3	14,841	94,5
2	10	3,823	47,3	11,223	50,4	10,082	64,2

geplanten Regressionsgeraden berechtigt sind, wobei sich für alle drei Organe diese Berechtigung ergab. Im Anschluß daran wurden die Regressionskoeffizienten der drei Geraden (b) berechnet, wodurch die Neigungen der Geraden bestimmt sind, ferner wurden als statistische Maßzahlen die Mittelwerte von Q_{O_2} (N) = $\bar{x}$ und ihre Standardfehler $s_{\bar{x}}$ sowie die Standardabweichung s ermittelt. Als Maß für die Abhängigkeit der beiden Merkmale voneinander – die Korrelation zwischen Alter und Zellatmung – gilt der Korrelationskoeffizient r. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 41 zusammengefaßt und in Abbildung 146 die Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Mit Hilfe dieser Methode konnten die ursprünglich zweifelhaften Kurven zwischen den Mittelwerten durch genau definierte Geraden ersetzt werden. Zugleich ist damit auch die Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen gegeben, das heißt also, daß die Gewebeatmung der Herz-, Leber- und Nierenhomogenate mit zunehmendem Alter der Tiere signifikant abnimmt.

Tabelle 41

Statistische Daten der Zellatmung

Organ	Alter	n	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	b	r	p
Herz	0,5	10	8,083	0,426			
	1	10	6,168	0,261	–2,13	0,9976	<0,001
	2	10	3,823	0,220			
Leber	0,5	10	22,279	0,987			
	1	10	15,010	0,806	–5,53	0,9919	<0,001
	2	10	11,223	0,447			
Niere	0,5	10	15,702	1,481			
	1	10	14,841	1,303	–2,81	0,9276	<0,001
	2	10	10,082	0,715			

Nach diesen statistisch gesicherten Ergebnissen gewann naturgemäß die weitere Frage, ob eine Möglichkeit der Aktivierung oder Verzögerung des Absinkens des Zellstoffwechsels durch die Injizierung von Zellmaterial besteht, wesentlich an Bedeutung.

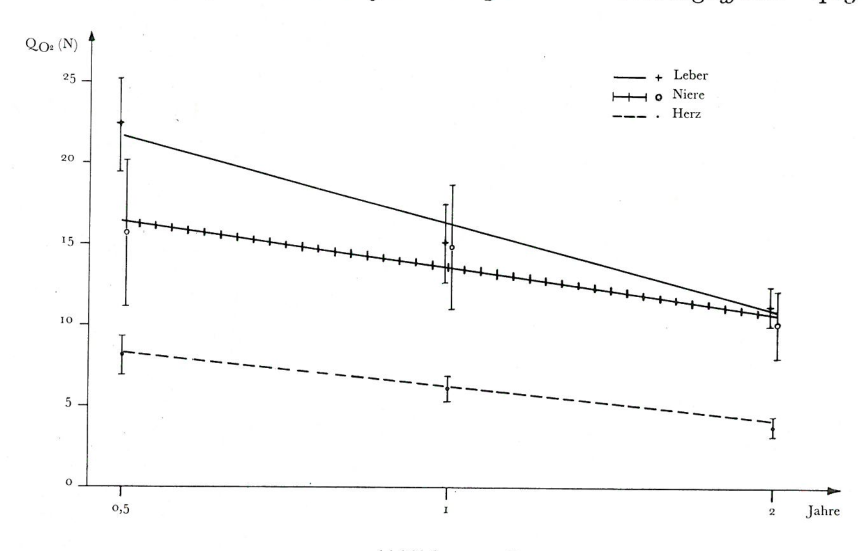


Abbildung 146

Die Regressionsgeraden der Zellatmung in verschiedenen Lebensaltern

b) Hauptversuch

Die Beurteilung der Einzelwerte erfolgte auch hier wieder mit Hilfe statistischer Methoden. In Tabelle 42 sind die statistischen Maßzahlen zusammengestellt. In ihrer Gesamtheit betrachtet, zeigte die Gruppe Placenta bei allen drei Organen einen signifikant höheren Q_{O_2} (N) als die Kontrollgruppe, während die Unterschiede zwischen Gruppe K und Gruppe Testis bei keinem Organ signifikant waren.

Bei der Aufteilung nach dem Geschlecht (Tabelle 43) stellte sich heraus, daß die weiblichen Tiere wesentlich besser auf die Substanzen ansprachen. Die Zellatmung war bei ihnen durch die Trockenzell-Placenta in allen Organen, durch die Testis-Trockenzellen in Herz und Leber signifikant höher als die der weiblichen Kontrolltiere, während bei den männlichen Ratten nur die Zellatmung des Herzmuskels und der 2-Stunden-Quotient der Niere durch die Placenta-Trockenzellen erhöht werden konnten, im Vergleich zur Zellatmung der männlichen Kontrolltiere.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse des Hauptversuches mit denen des Vorversuches stellt sich heraus, daß die Werte gut

Tabelle 42

Die Wirkung von Siccazellen auf die Zellatmung

Gruppe	Tierzahl	h	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	p
			Herz		
K	21	1	4,56	0,374	
		2	5,68	0,426	
P	19	1	7,07	0,450	< 0,001
		2	11,55	0,865	< 0,001
T	24	1	5,38	0,331	< 0,2
		2	7,44	0,324	< 0,8
			Leber		
K	21	1	11,97	0,368	
		2	14,76	0,392	
P	19	1	13,50	0,643	< 0,05
		2	18,31	0,976	< 0,01
T	24	1	12,36	0,443	< 0,6
		2	15,99	0,577	< 0,1
			Niere		
K	21	1	12,48	0,636	
		2	17,01	0,860	
P	19	1	15,64	0,448	< 0,001
		2	23,31	0,815	< 0,001
T	24	1	13,65	0,423	< 0,2
		2	18,67	0,672	< 0,2

übereinstimmen. In Abbildung 147 sind die Regressionsgeraden des Vorversuches noch einmal wiedergegeben und darauf nun die Durchschnitte der Quotienten mit ihrem dreifachen Standardfehler (±) jeder Gruppe des Hauptversuches eingetragen. Daraus läßt sich gut ersehen, daß, nach Verabreichung von Placenta-, beziehungsweise Testis-Trockenzellen, die Intensität der Zellatmung von Herz, Leber und Niere eindeutig nach links, das heißt also in den Bereich der höheren Aktivität der jüngeren Tiere, verschoben liegt. Bei unseren Versuchstieren zeigte sich also der objektiv faßbare Re-

Tabelle 43

Die Wirkung von Siccazellen auf die Zellatmung unter Berücksichtigung des Geschlechtes

Gr.	Tierzahl		h	$\bar{x}$		$s_{\bar{x}}$		p	
	m.	w.		m.	w.	m.	w.	m.	w.
				Herz					
K	11	10	1	5,57	3,44	0,555	0,131		
			2	6,43	4,85	0,641	0,448		
P	8	11	1	7,54	6,74	0,637	0,624	< 0,05	< 0,001
			2	12,88	10,58	1,234	1,154	< 0,001	< 0,001
T	12	12	1	4,88	5,87	0,449	0,462	< 0,4	< 0,001
			2	6,69	8,18	0,583	0,560	< 0,8	< 0,001
				Leber					
K	11	10	1	12,43	11,46	0,587	0,394		
			2	14,41	15,15	0,674	0,341		
P	8	11	1	13,34	13,63	1,014	0,857	< 0,5	< 0,05
			2	17,15	19,15	1,160	1,552	< 0,1	< 0,05
T	12	12	1	11,73	12,98	0,804	0,343	< 0,5	< 0,02
			2	14,89	17,08	0,962	0,517	< 0,7	< 0,01
				Niere					
K	11	10	1	12,86	12,06	0,736	1,093		
			2	12,13	16,89	3,072	1,536		
P	8	11	1	15,24	15,94	0,822	0,497	< 0,1	< 0,01
			2	22,61	23,81	1,382	1,028	< 0,02	< 0,01
T	12	12	1	12,87	14,42	0,600	0,543	< 0,9	< 0,1
			2	17,39	19,94	0,843	0,949	< 0,3	< 0,2

vitalisierungseffekt nach Zellinjektionen darin, daß die Zellatmung von Herz, Leber und Niere einem beträchtlich jüngeren biologischen Alter entsprach, als die Versuchsratten tatsächlich hatten.

c) Ergänzungsversuch

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 44 und 45 zusammengefaßt und in der Abbildung 148 graphisch dargestellt. Daraus ist ersichtlich,

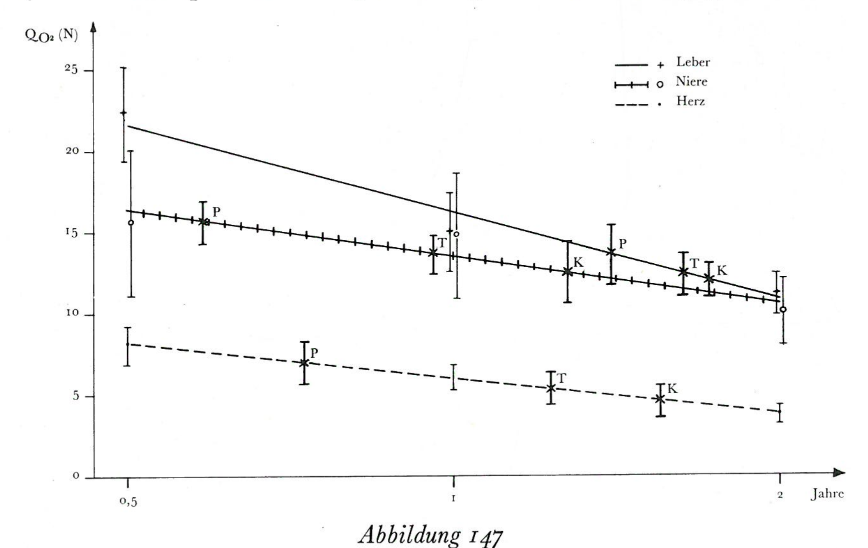


Abbildung 147
Die Regressionsgeraden der Zellatmung und die Wirkung der Siccacell-Behandlung

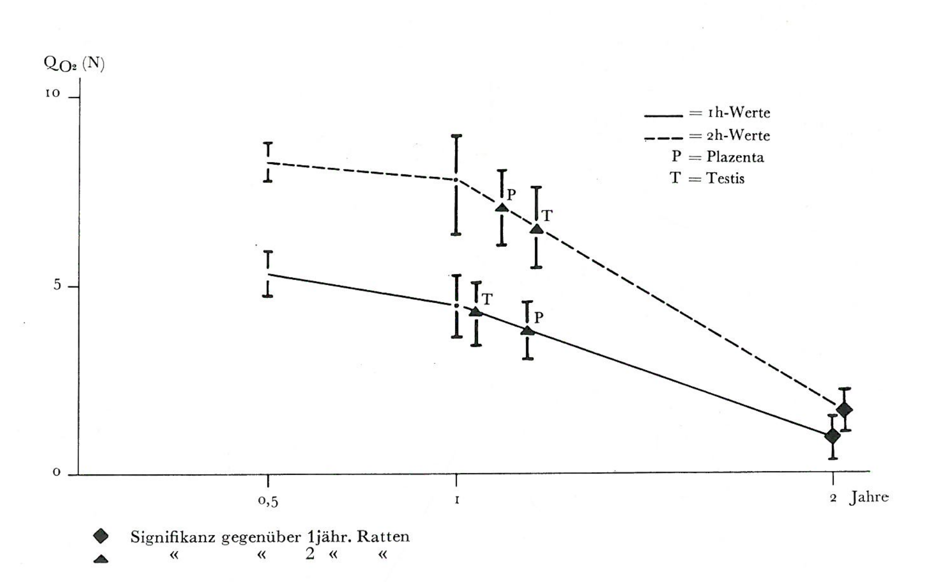


Abbildung 148
Spontanatmung der Aorta nach Siccacell-Behandlung

daß die Intensität der Spontanatmung während der zweistündigen Untersuchungsdauer nicht konstant blieb, sondern im Verlauf der Zeit abnahm. Der O_2-Verbrauch in der zweiten Untersuchungsstunde betrug, wie aus Abbildung 148 deutlich hervorgeht, nur ungefähr die Hälfte der Aufnahme während der ersten Stunde. Die Spontanatmung der Aortenhomogenate der einjährigen Tiere war sowohl nach einer als auch nach zwei Stunden Untersuchungszeit geringer als die der halbjährigen; die statistische Bearbeitung ergab aber keine Signifikanz. Im Verlauf des zweiten Lebensjahres nahm die Spontanatmung der Aorten stark ab, denn der O_2-Verbrauch der zweijährigen Ratten betrug sowohl nach einer als auch nach zwei Stunden Versuchsdauer rund ein Viertel des Verbrauches der einjährigen und rund ein Fünftel dessen der halbjährigen Tiere.

Tabelle 44

Spontanatmung der Aorta (Einstundenwerte)

Symb.	Ratten				
	½ j.	1 j.	2 j.	Plac. S. Z.	Test. S. Z.
n	12	12	12	11	13
$\bar{x}$	5,27	4,39	1,05	3,72	4,21
$s_{\bar{x}}$	0,444	0,861	0,487	0,671	0,919
P ½j.		0,4	0,001		
P 1 j.			0,001		
P 2j.				0,01	0,01

Tabelle 45

Spontanatmung der Aorta (Zweistundenwerte)

Symb.	Ratten				
	½ j.	1 j.	2 j.	Plac. S. Z.	Test. S. Z.
n	12	12	12	11	13
$\bar{x}$	8,28	7,73	1,70	6,92	6,44
$s_{\bar{x}}$	0,415	1,357	0,841	0,940	1,143
P ½j.		0,8	0,001		
P 1 j.			0,01		
P 2j.				0,001	0,01

Der Vergleich der Ein- und Zweistunden-Q_{O_2} (N) der zweijährigen Ratten mit denen der halb- und einjährigen ergab jedesmal hohe statistische Sicherheit.

Sowohl die mit Placenta- als auch die mit Testis-Trockenzellen vorbehandelten Tiere zeigten eine Spontanatmung der Aortenhomogenate, die signifikant höher war als die der gleichaltrigen unbehandelten Ratten. Nach einer Stunde verbrauchten die Aorten der Testisgruppe etwas mehr O_2 als die der Placenta-Gruppe, nach der zweiten Stunde der Untersuchung war es umgekehrt. Die Differenzen zwischen den beiden behandelten Gruppen waren aber zu beiden Zeitpunkten nur gering.

Diskussion

Über die Abnahme der Zellatmung mit dem Alter finden sich in der zugänglichen Literatur nur wenige Angaben. LAZOVSKAYA (1943) sowie BRIGGS und Mitarbeiter (1949) hatten ähnliche Untersuchungen an Aorten verschieden alter Ratten durchgeführt. Die Angaben von LAZOVSKAYA stimmen mit unseren Ergebnissen gut überein. Sie fand bei Aortenhomogenaten von drei Wochen alten Ratten eine vierzehnmal größere O_2-Aufnahme als von solchen einjähriger Ratten. BRIGGS und Mitarbeiter (1949) hingegen konnten bei Aortenhomogenaten überhaupt keine Spontanatmung beobachten; bei der Verwendung von Aortenschnitten trat zwar Spontanatmung auf, doch war kein Unterschied zwischen jungen und alten Tieren festzustellen. Die von ROSENTHAL und Mitarbeitern (1942) untersuchten Gelenkknorpel von Rindern zeigten ebenfalls eine starke Abnahme des O_2-Verbrauches mit zunehmendem Alter. BARROWS und Mitarbeiter (1958) untersuchten den Stoffwechsel bei Ratten, im Zusammenhang mit der Aktivität verschiedener Enzyme und mit der Anzahl von Zellen, die sich aus dem Gehalt an Desoxyribonucleinsäure errechneten. Sie verwendeten für ihre Untersuchungen Gewebeschnitte. Beim Herz bestimmten sie zwar nicht die O_2-Aufnahme, die Enzymaktivität war aber bei den alten Tieren signifikant geringer als bei den jungen. Bei der Atmung der Niere stimmten sie mit den vorliegenden Ergebnissen überein, während die Atmung der Leberschnitte verschieden alter Tiere keine Unterschiede ergab. Die gleichen Untersuchungen mit Leberschnitten führten ROSS und ELY (1954) bei männlichen Ratten und JACOB und Mit-

arbeiter (1954) bei weiblichen Ratten durch, wobei die beiden Gruppen signifikante Unterschiede zwischen jungen und alten Tieren fanden.

Eine Anregung des Zellstoffwechsels konnten in indirekter Weise DITTMAR und Mitarbeiter (1955) durch die wachstumsfördernde Wirkung von Zellaufschwemmungen bei juvenilen Mäusen demonstrieren. MOHR und MÖLLHOFF (1953) fanden, daß es nach der Verabreichung von Organlysaten zu einer Glykogenverarmung der Leber kommt, und sie schließen daraus auf eine Steigerung des Zellstoffwechsels. LOCKER und MOSER (1956) führten Untersuchungen über die Aktivierung der Leberatmung durch Gewebsextrakte in vitro durch. Sie fanden, daß der O_2-Verbrauch von Rattenleberschnitten durch Leber- oder Muskelextrakt gesteigert wurde. PERKINSON und IRVING (1956) führten bei Ratten Hepatektomie durch und kontrollierten im Anschluß daran den O_2-Verbrauch der rasch regenerierenden Restleber, der gegenüber dem der scheinoperierten Kontrolltiere deutlich erhöht war. Diese Ergebnisse stehen vielleicht mit dem hier dargelegten Versuch in Zusammenhang und unterstützen die Annahme einer funktionellen Regeneration in der Revitalisierungsphase. Nach peroraler Verabreichung von placentaren Wirkstoffen konnten HESS und HESS (1952) keine Veränderung des O_2-Verbrauches bei Ratten feststellen.

X. Mitochondrienstudien

(KMENT, A., LEIBETSEDER, J., STEININGER, K., 1962)

Einleitung

An der Erforschung der Mitochondrien sind heute die verschiedensten Zweige der Naturwissenschaften, der Biologie und der Medizin interessiert. Für das Verständnis des physiologischen und pathologischen Geschehens und der Therapie sind die Mitochondrien vor allem deswegen so interessant, weil in ihrem Bereich die Funktionen auf fast makromolekularem Niveau ablaufen. Die Menge der Mitochondrien kann bis zu 25 % der Zellmasse betragen (LANG, 1951/52), sie ist aber stark abhängig von der Zellart und dem Funktionszustand. Vom Embryonalstadium über die Wachstumsphase bis zum adulten Organismus nimmt die Zahl der Mitochondrien allgemein ab (MEVES, 1908). Andererseits finden wir in den Geschlechtszellen

noch im höheren Lebensalter reichlich Mitochondrien. Allgemein besitzen stoffwechselaktive Zellen eine größere Zahl an Mitochondrien als Zellen mit herabgesetzter Aktivität (LAUDAHN, 1959); eine funktionstüchige Zelle wird keinen völligen Verlust ihrer Mitochondrien aufweisen (THIEL, 1959). Die Aktivität soll, außer von der Zellart, auch von der Länge der Mitochondrien abhängen (TOBIOKE, 1956). Die Mitochondrien als typische Träger von Multienzymsystemen treffen wir vor allem dort im Zellbereich an, wo der Energieverbrauch am größten ist, sei es für eine Grundfunktion oder eine spezifische Leistung der Zelle. Gerade die Cristae zeigen als Enzymträger eine Zunahme, wenn erhöhte Leistungen der Zelle erfolgen (LUND, 1958). Bei den elektronenoptisch sehr dichten Partikelchen der Cristae («droplets») wird angenommen, daß es sich um Stoffanreicherungen handelt, die Ausdruck von Funktionsänderungen sind (LOW, 1956) oder Vorstufen cytoplasmatischer Granula innerhalb der Mitochondrien (LEVER, 1957).

Die enzymatische Aktivität der Mitochondrien wurde schon von WARBURG studiert. Der Beweis, daß wichtige Enzymsysteme an die Zellorganellen gebunden sind, wurde von KELLIN und seiner Schule nachgewiesen. Die wesentliche Leistung der Mitochondrien besteht in der Endoxydation der Nährstoffe und in der Bereitstellung energiereicher Phosphatverbindungen. Die Mitochondrien können als «Kraftwerke» der Zelle aufgefaßt werden (HAAS, 1955), sie scheinen aber auch Funktionen synthetischer Natur zu besitzen (LEUTHARD und MÜLLER, 1948) und das Vorhandensein von Proteinkristallen in den Mitochondrien (NAPOLITANO und FAWZETT, 1958) legt den Gedanken nahe, in den Mitochondrien außer den oben angeführten Funktionen auch solche wie Aufnahme, Umwandlung und Abgabe von Stoffen anzunehmen. Es war nun interessant, tierexperimentell zu überprüfen, ob die Verabreichung von Trockenzellen einen Einfluß auf die Zahl und den Enzymgehalt von Mitochondrien hat.

Methoden

a) Bestimmung der Mitochondrienzahl (SHELTON und Mitarbeiter, 1933): Gewebe von Herz und Leber wurde im Potter-Elvehjem-Homogenisator 10 Minuten unter Eiskühlung in einer 0,25 M Rohrzuckerlösung (1:10) homogenisiert. Davon wurden mit einer Pipette 0,1 ml entnommen, in einen Erlenmeyer-Kolben gebracht und gut mit

29,9 ml einer 0,125 M Rohrzuckerlösung vermischt. Mittels Glasstab wurde das verdünnte Homogenat zur Füllung einer Bakterienzählkammer nach Petroff-Haußer verwendet und die Mitochondrienzahl durch deren Zählung im Phasenkontrastmikroskop und anschließende Umrechnung auf 1 g Gewebe festgestellt.

b) Bestimmung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase (Succinoxydase) im Warburg-Apparat (SCHNEIDER und POTTER, 1943): Herz und Leber wurden rasch entnommen und von 0,2 g Gewebe, unter Verwendung des Glashomogenisators von POTTER-ELVEHJEM, ein 5prozentiges wässeriges Homogenat hergestellt. Unter Einhaltung der für diese Methode vorgesehenen Angaben wurden von jedem Homogenat zwei WARBURG-Kölbchen mit einem 100prozentigen Unterschied der Homogenatmenge angesetzt. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von 10 Minuten, die gesamte Untersuchungsdauer betrug 1 Stunde. Die Angabe der Werte erfolgte als Mittelwert der beiden verwendeten Homogenatmengen in μc O_2/h/mg Trockengewebe. Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgte an entsprechenden Organstücken.

Tiermaterial (siehe II a, Seite 409)

Zur Untersuchung gelangten insgesamt 91 Ratten in folgenden Versuchsgruppen:

Gruppe J: 5 Monate alte Kontrolltiere (11 Männchen und 12 Weibchen).

Gruppe A: Alte Kontrolltiere (21 Monate alt, 6 Männchen und 16 Weibchen).

Gruppe I: Mit Substanz I (Placenta-Trockenzellen) behandelte Tiere (zu Versuchsbeginn 1 Jahr alt, 13 Männchen und 9 Weibchen).

Gruppe II: Mit Substanz II (Testis-Trockenzellen) behandelte Tiere (zu Versuchsbeginn 1 Jahr alt, 13 Männchen und 11 Weibchen).

Gruppe K: Gruppe J und Gruppe A.

Versuchsergebnisse

Die männlichen Ratten zeigten weder bei der Zahl der Mitochondrien noch bei der Succinoxydase-Aktivität des Herzens oder der

Leber eine signifikante Differenz zwischen jungen und alten Tieren. Bei den weiblichen Ratten dagegen war ein signifikanter Unterschied sowohl bei der Mitochondrienzahl als auch bei der Succinoxydase-Aktivität von Herz und Leber zwischen den 5- und 21-monatigen Versuchstieren festzustellen. Die fehlende Signifikanz bei den männlichen Ratten hat vielleicht ihren Grund in der höheren Absterberate der männlichen Versuchsgruppe I (alt) und der daraus resultierenden ungünstigen Berechnungslage mit schließlich nur mehr 6 Ratten. Aus diesem Grund wurden die jungen und alten Ratten zur Gruppe K zusammengefaßt und gemeinsam biostatistisch ausgewertet (Abbildung 149 und Tabelle 46).

Die Succinoxydase gilt als typisches Enzym der Mitochondrien. Ihre Aktivität wurde bei den männlichen Tieren durch die Substanz I

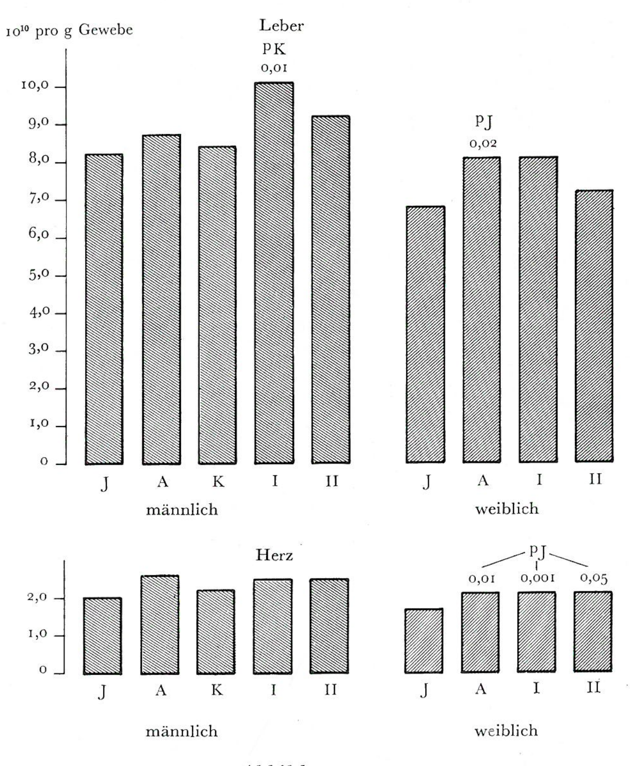


Abbildung 149
Mitochondrienzahl

Tabelle 46

Mitochondrienzahl

Geschlecht			männlich					weiblich			
Gruppe			J	A	K	I	II	J	A	I	II
Tierzahl			11	6	17	13	13	12	16	9	11
Mitochondrienzahl (10^{10} pro g Gewebe)	Leber	$\bar{x}$	8,25	8,71	8,42	10,15	9,20	6,84	8,06	8,09	7,21
		$s_{\bar{x}}$	0,511	0,704	0,399	0,416	0,504	0,344	0,298	0,738	0,298
		p_J		0,7					0,02	0,2	0,5
		p_A								0,9	0,1
		p_K				0,01	0,3				
	Herz	$\bar{x}$	2,02	2,62	2,23	2,47	2,48	1,69	2,13	2,06	2,05
		$s_{\bar{x}}$	0,076	0,285	0,129	0,101	0,106	0,042	0,118	0,072	0,142
		p_J		0,1					0,01	0,001	0,05
		p_A								0,7	0,7
		p_K				0,2	0,2				

sowohl in der Leber als auch im Herz signifikant erhöht ($p < 0{,}01$), durch die Substanz II nur in der Leber ($p < 0{,}05$). Bei den weiblichen Tieren wurde in beiden untersuchten Organen durch die Substanz I die Signifikanz zwischen jungen und alten Tieren aufgehoben, eine Signifikanz gegenüber den alten Ratten kam jedoch nicht zustande. Ersteres spricht für eine Verschiebung in Richtung des Verhaltens

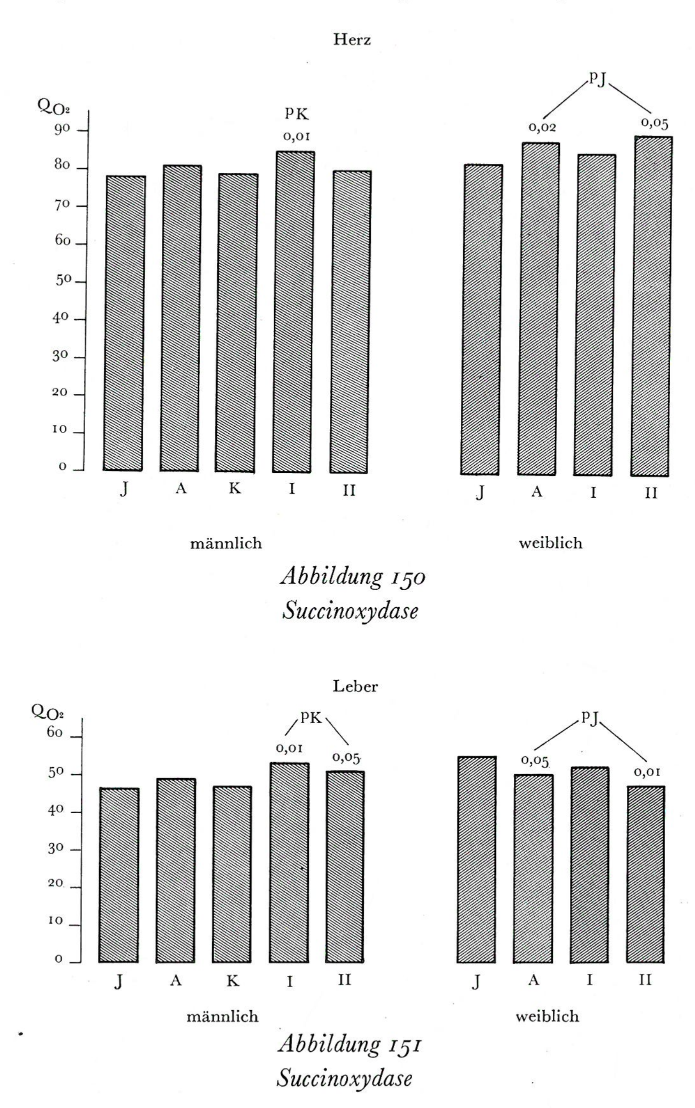


Abbildung 150
Succinoxydase

Abbildung 151
Succinoxydase

Tabelle 47

Succinoxydase-Aktivität

Geschlecht		männlich					weiblich			
Gruppe		J	A	K	I	II	J	A	I	II
Tierzahl		11	6	17	13	13	12	16	9	11
Succinoxydase-Aktivität (Q_{O_2}) Leber	$\bar{x}$	46,16	48,58	47,01	53,29	51,21	55,06	50,43	51,57	46,49
	$s_{\bar{x}}$	1,421	1,735	1,115	1,758	1,900	1,749	1,192	2,038	1,575
	p_J		0,3					0,05	0,3	0,01
	p_A								0,7	0,1
	p_K				0,01	0,05				
Herz	$\bar{x}$	78,05	81,17	79,15	84,80	79,66	81,62	87,89	84,95	89,78
	$s_{\bar{x}}$	0,894	2,954	1,196	1,534	3,476	1,658	1,783	3,816	2,945
	p_J		0,4					0,02	0,5	0,05
	p_A								0,5	0,6
	p_K				0,01	0,9				

jüngerer Tiere. Die mit Substanz II behandelten Weibchen zeigten, wie die unbehandelten Kontrollweibchen, in Leber und Herz eine signifikante Verschiedenheit gegenüber den jungen Tieren (Abbildungen 150 und 151, Tabelle 47).

Die Mitochondrienzahl war in der Leber der mit Substanz I behandelten männlichen Ratten gegenüber den Kontrollen signifikant verschieden. Bei den Weibchen wurde nur in der Leber durch beide Substanzen die zwischen jungen und alten Tieren bestehende signifikante Differenz aufgehoben, was einer Annäherung an die jungen Ratten gleichkommt. Die Mitochondrienzahl der Herzen wurde durch die Verabreichung der Trockenzellen nicht signifikant beeinflußt.

Diskussion

Es muß bei der Interpretierung der Mitochondrienzahl und der Succinoxydase-Aktivität des vorliegenden Versuches darauf hingewiesen werden, daß es sich hier um Näherungswerte handelt. Für Forschungen auf diesem morphologisch-funktionellen Grenzgebiet der Zelle wurde sehr richtig bemerkt, daß «bei allen Untersuchungsergebnissen jedoch berücksichtigt werden muß, daß, außer durch die Herstellungsmethodik, *Abweichungen* der einzelnen Analysendaten auch durch das Alter, die Ernährungsverhältnisse, das Geschlecht des Spendertieres und nicht zuletzt durch die Analysenmethodik selbst zustandekommen. Die große Zahl der einflußnehmenden Faktoren zwingt daher, die bisherigen Ergebnisse nicht zu verallgemeinern oder überzubewerten» (LAUDAHN, 1959). Dies soll auch für die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse gelten. Die Verschiebung im Succinoxydasegehalt in Richtung jüngerer Tiere bei den mit Placenta-Trockenzellen behandelten Ratten wäre weiter zu verfolgen, auch im Hinblick darauf, daß Zusammenhänge zwischen Alterungsprozeß und Stoffwechselaktivität der Mitochondrien mitgeteilt wurden (WEINBACH und GARBUS, 1956). So zeigten isolierte Mitochondrien des Gehirns, im Gegensatz zu den Lebermitochondrien, bei alten Ratten eine eindeutige Verminderung der Substratoxydation und der Phosphatveresterung. Auf die Möglichkeit des damit zusammenhängenden verschiedenen Tempos der Gewebealterung wurde aufmerksam gemacht (LAUDAHN, 1959), und damit sind auch die Fragen des malignen Wachstums berührt. LETTRÉ und Mitarbeiter (1953) haben darauf hingewiesen, daß anscheinend eine

Vermehrung der Mitochondrien notwendigerweise der Zellteilung und den Regenerationsprozessen vorangeht. Bei Aktivitätsstudien verschiedener Dehydrogenasen an isolierten Mitochondrien von Rattenlebern nach akuten CCl_4-Vergiftungen ergab sich eine erhebliche Zunahme der Aktivität über mehrere Wochen (LAUDAHN, 1956), wobei neben einer Zunahme der Mitochondrien auch eine echte Neubildung verschiedener Fermente diskutiert wurde. Jedenfalls hat die elektronenmikroskopische Überprüfung von durch Biopsie gewonnenem pathologischen Gewebe bei Mensch und Tier gezeigt, daß die Mitochondrien schon sehr frühzeitig im Verlauf krankhafter Prozesse Abwandlungen ihrer Feinstruktur zeigen (BERNHARD, 1957). Bei den engen Beziehungen, die zwischen Struktur und Funktion der Zelle und ihrer Organellen einerseits und dem zwangsläufigen Abnutzungs- und Alterungsprozeß, der so häufig die Basis von Erkrankungen abgibt, andererseits bestehen, ist es naheliegend, den Mitochondrien auch in dieser Hinsicht mehr Augenmerk als bisher zuzuwenden. Im Gesamtkomplex der Revitalisierung im Rahmen der Zellulartherapie scheint eine Mitbeteiligung der Mitochondrien tatsächlich vorzuliegen.

XI. Abschluß

Die Revitalisierung ist ein wesentliches Faktum der Zellulartherapie nach NIEHANS. Spricht man von Vitalität, so muß zugleich darauf hingewiesen werden, daß dieser Begriff im Grunde nichts anderes ausdrückt, als «daß das Leben eine dynamische Erscheinung ist» (NETTER, 1959). Damit aber sind ein gewisser Zustand von Arbeitsfähigkeit und die Möglichkeit verschiedener biologischer Leistungen gegeben, das heißt also, es liegen in den Lebensprozessen immer zwei Grundkomponenten vor: die der Struktur und die der Funktion. Die Untersuchung der energetischen Grundlagen der Lebensvorgänge, also auch der Vitalität, zeigt die Fähigkeit der lebenden Substanz und der Organismen, «die Entropievermehrung ihrer Umgebung verlangsamt ablaufen zu lassen» (NETTER, 1959).

Bei der Betrachtung der dynamischen und strukturellen Funktionseinheiten der Organismen oder Zellen ist ersichtlich, daß «alle Stoffwechselvorgänge dem strukturgebundenen Steuerungssystem unterliegen und auch diese Steuerungen nicht ideal reversibel verlaufen können» (NETTER, 1959). Ihre Betätigung ist somit zwangs-

läufig stets mit einer Dissipation verbunden. JUNG (1956) sieht in dieser Richtung eine der wesentlichen Ursachen für die grundsätzliche Unmöglichkeit der Lebensumkehr. KUHN (1958) hat seine Theorie des Alterns, und damit auch die des altersbedingten physiologischen Vitalitätsabbaues, in Beziehung zur «Reinerhaltung der optischen Konfiguration als eine besondere Eigenschaft der lebendigen Organisation» (NETTER, 1959) gesetzt. Der gleiche Autor schreibt dazu (1959): «Wenn der Organismus den Bautyp seiner Stoffe bewahren, das heißt, wenn er zum Beispiel die gegebene Form seiner Proteinstruktur erhalten soll, dann können dazu nur bestimmte, zum Beispiel also L-konfigurierte Aminosäuren, benutzt werden. Daß im Alter eine, wenn auch recht kleine Menge der entgegengesetzten Antipoden auftritt, wäre nicht nur als ein Nachlassen der Mittel zur optischen Selektion anzusehen, vielmehr ist es nach KUHN grundsätzlich auch bei Einsatz aller Möglichkeiten nicht vermeidbar. Dementsprechend wäre bei Fortfall aller übrigen Altersursachen die Lebensdauer durch die prinzipiell unvermeidbare Abnahme des optischen Reinheitsgrades asymmetrischer Stoffe an enzymatischen Strukturen begrenzt.»

Nachdem sich die wissenschaftliche Medizin nur der Einzelbetrachtung (SCHNEIDER, 1962) in der Forschung bedienen kann, war es nötig, das Phänomen Revitalisierung in Teilprozessen zu untersuchen. Es schien angezeigt, das Tierexperiment zu verwenden und die gemessenen Einzelbetrachtungen biostatistisch zu verarbeiten. Die hier mitgeteilten tierexperimentellen Ergebnisse sind als Teilprozesse eines Gesamtvorganges anzusehen. Allgemein ausgedrückt handelt es sich um signifikante Vitalitätsteigerungen oder um eine signifikante Verlangsamung des Vitalitätsabbaues. Der Begriff «Revitalisierung», der sich eingebürgert hat, meint im Grunde das Gleiche. Vielleicht beruht der Revitalisierungseffekt bei der NIEHANSschen Zellulartherapie auf einer Beeinflussung der von KUHN als so entscheidend erkannten optischen Selektionsfähigkeit von lebenswichtigen Zellstrukturen.

Die vorliegenden tierexperimentellen Resultate über Revitalisierung unterstützen die Ansicht BERNHARDS (1956), daß die Zellulartherapie in der Lage ist, durch Verbesserung elementarer Funktionen des Organismus den Allgemeinzustand günstig zu beeinflussen. Durch diese Hebung des Allgemeinzustandes – «Revitalisierung» –

gelingt es dem Organismus vielfach leichter, verschiedenen schädlichen Einwirkungen standzuhalten. Der Tod tritt meistens nicht durch das Alter an und für sich ein, sondern überwiegend durch Krankheiten, die in altersgeschwächten Organismen einen tödlichen Verlauf nehmen.



Einflüsse auf Tumoren



Zellulartherapie bei Geschwülsten

VON PROF. DR. HERMANN HOEPKE, HEIDELBERG

Verstreut in Organen und Geweben besitzt – bis in das Alter hinein – jeder Organismus undifferenziert gebliebenes, fetales, pluripotentes Mesoderm. Es ist das reticulo-endotheliale System (R. E. S.). Zu ihm gehören die Reticulum-Zellen, die aus dem Reticulum stammenden Uferzellen der Sinusoide in Milz und Lymphknoten, Knochenmark und Leber und die Histiocyten. Aus Zellen des R. E. S. entstehen die Lymphocyten jeder Größe, Plasmazellen, Monocyten und auch die Gewebs-Mastzellen. Zählt man die Histiocyten nicht zu dieser Zellgruppe, dann kann man vom retothelialen System sprechen.

Es ist sehr merkwürdig, wie wenig von vielen Klinikern die entscheidende Rolle dieses Systems bei der Abwehr von Geschwülsten, bei der Bildung von Antikörpern und bei der Immunität gewürdigt wird. Und doch ist seine Bedeutung durch Beobachtungen und Experimente einwandfrei erwiesen.

Durch mehrere eigene Arbeiten über Milz und Thymus war klar geworden, daß dem R. E. S. bei der Abwehr von Geschwülsten eine entscheidende Rolle zukommt. Die Abbildungen 152–154 zeigen deutlich, wie stark sich das Bild der normalen Milz ändert, wenn eine durch Benzpyren verursachte Geschwulst größer wird. In der roten Pulpa bilden sich überall basophile Zellen: kleine und große Lymphocyten und Plasma-Zellen. Auch die Keimzentren vergrößern sich und bilden vermehrt Zellen. Schließlich ist die rote Pulpa so dicht von weißen Zellen erfüllt, daß eine Speicherung roten Blutes kaum noch möglich ist (Abbildung 154).

1952 konnte gezeigt werden, wie Walker-Tumoren von Lymphocyten, Histiocyten und Makrophagen eingekesselt und vernichtet werden (Abbildung 155). In den Kapillaren von Leber und Nebenniere wurden Lymphozyten im Übermaß, das heißt stellenweise sogar auf Kosten des Parenchyms, gebildet.

G. Bersch (1953) zählte die Mitosen in Walker-Tumoren. Von 100 Mitosen waren nur 4% normal, 0,2% pluripolar, alle anderen

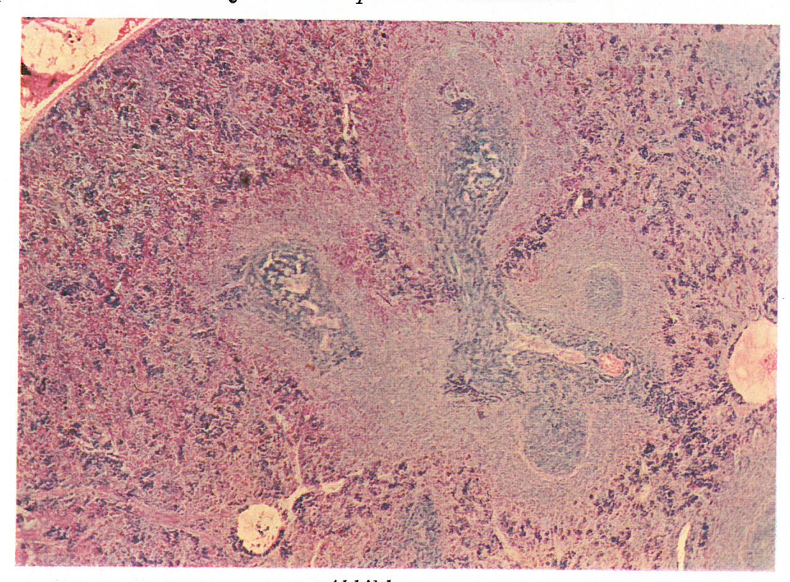


Abbildung 152

Normale Rattenmilz mit einigen Follikeln. In der roten Pulpa sieht man hauptsächlich rote Blutzellen. Fixierung Susa, Färbung Cardos.

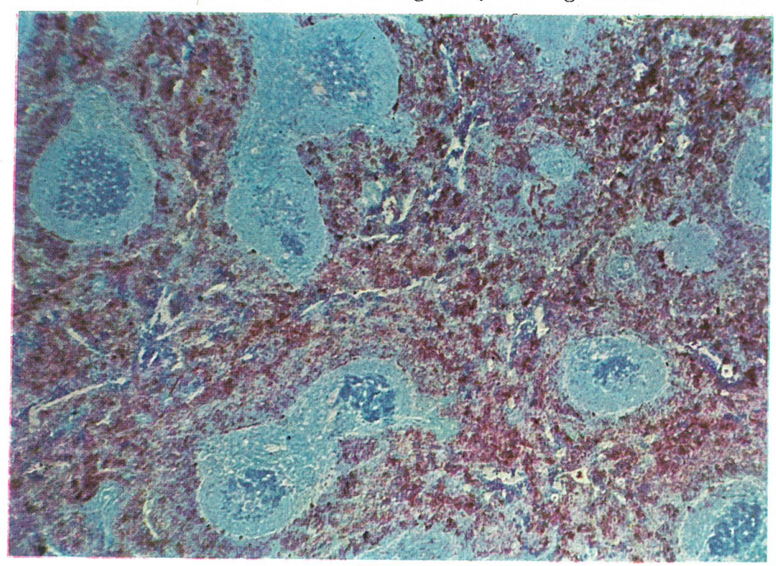


Abbildung 153

Leicht durch den Tumor aktivierte Rattenmilz. In den Follikeln haben sich zahlreiche große Lymphocyten gebildet. Fixierung Susa, Färbung Cardos.

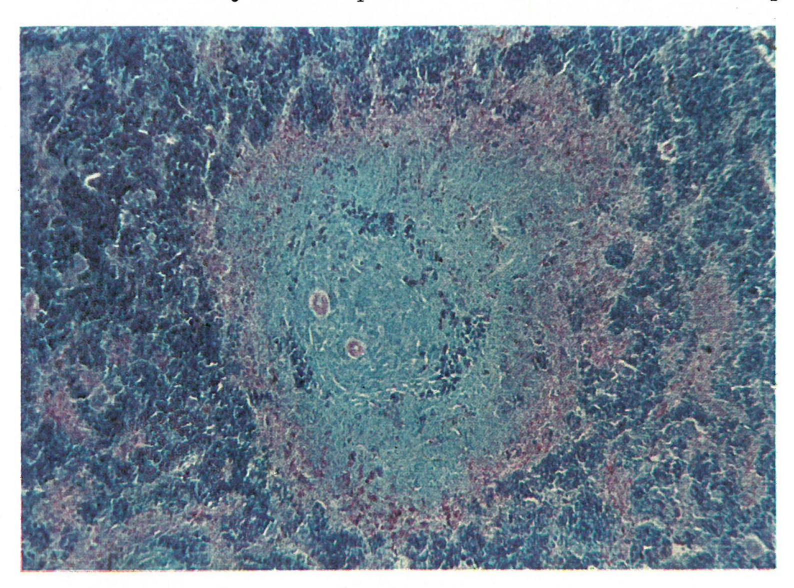


Abbildung 154
Stark aktivierte Rattenmilz. Die rote Pulpa ist vollkommen erfüllt von basophilen Lymphocyten verschiedener Größe. Fixierung Susa, Färbung Cardos.

– also 95,8 % – waren verklumpt oder ungeordnet, führten also nicht zu normalen Teilungen. Daß eine solche Hemmung des Tumor-Wachstums der Milz zuzuschreiben war, wurde durch ihre operative Entfernung bewiesen: die normalen Mitosen stiegen von 4 % auf 50 % an.

Ganz ähnliche Zahlen ergaben sich bei Benzpyren-Tumoren von Ratten. Die meisten Mitose-Störungen zeigten sich in den Tumoren, in denen zahlreiche Lymphocyten und Plasmazellen lagen. Zur Kontrolle wurde das Darm-Epithel untersucht, in dem zwar auch Mitosen gestört waren, wahrscheinlich durch Toxine des Tumors. Ihre Zahl war aber wesentlich geringer als in der Geschwulst.

Daß Plasma-Zellen – heute allgemein als Bildner von Antikörpern bekannt – Tumor-Zellen vernichten, konnte 1953 gezeigt werden. Sie strecken feinste Füßchen gegen die Zellen aus und entleeren offenbar den Inhalt ihrer Vacuolen. In ihrer Umgebung verdämmern und verschwinden die Geschwulst-Zellen (Abbildungen

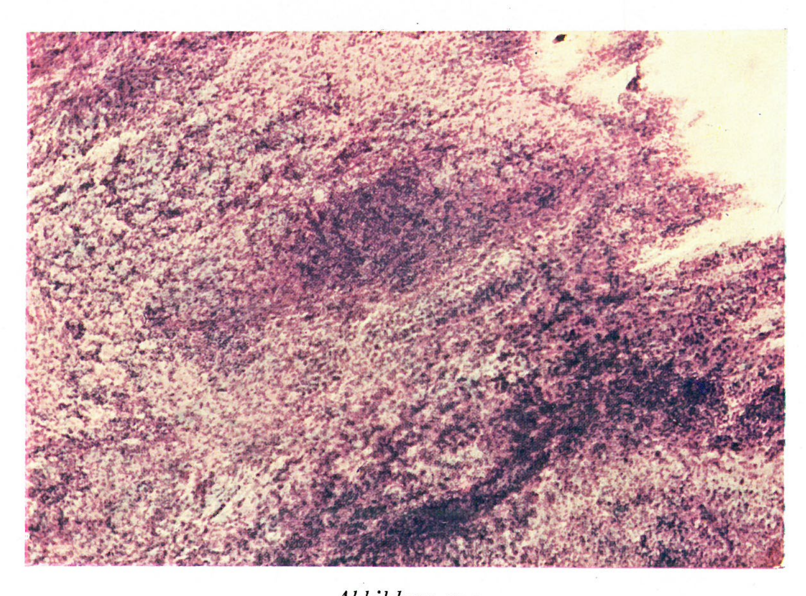


Abbildung 155
Letzte Reste eines Benzpyren-Tumors. Wo die Tumorzellen lagen, sieht man nur Lymphocyten, Plasmazellen, Mastzellen und Makrophagen. Fixierung Susa, Färbung Cardos.

156 und 157). Schon die ersten, noch nicht im Verband liegenden Tumor-Zellen sind von kleinen Lymphocyten und Plasma-Zellen umgeben (Abbildungen 158 und 159). KIDD und TOOLAN (1950) hatten bereits gezeigt, daß kleine Lymphocyten Tumor-Zellen vernichten. In eigenen Untersuchungen konnte das immer wieder bestätigt werden.

Schließlich konnte W. KÖNIG (1955) nachweisen, daß dort, wo in einem Tumor Mastzellen liegen, keine Mitosen vorkommen. Die Mastzellen sondern offenbar einen Stoff ab, der Zellteilungen unterdrückt. Das führt natürlich zur Rückbildung einer Geschwulst. Mastzellen treten aber nicht in jeder Geschwulst auf, manchmal liegen sie nur in mehr oder weniger großen Bezirken. Das hängt nach eigenen Beobachtungen (HOEPKE und SCHEPELMANN 1961) vom Milieu der Körpersäfte ab. Die Mastzellen bevorzugen, wie es scheint, ein saures Milieu.

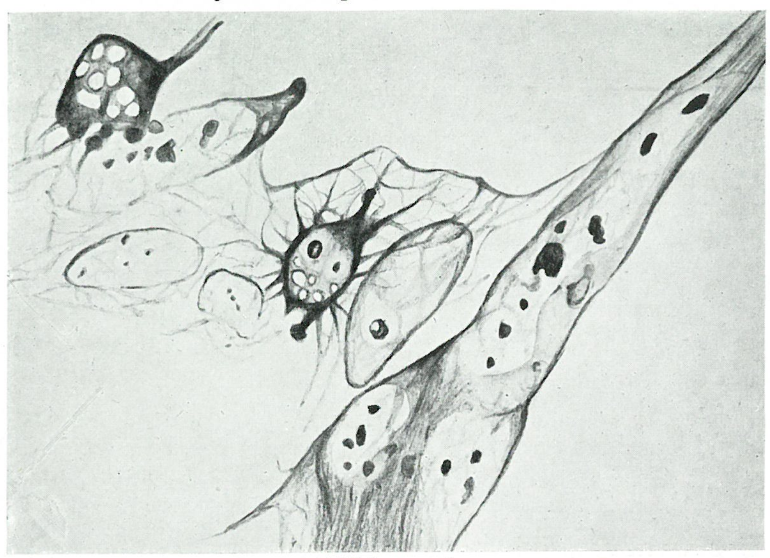


Abbildung 156
Aus einem Schnitt durch einen Benzpyren-Tumor. Oben liegt eine große Tumorzelle, die bereits ihre Färbbarkeit eingebüßt hat. Eine Plasmazelle hat Pseudopodien ausgestreckt und offenbar ihre Vacuolen entleert. Unten drei blasse Tumorzellkerne mit einer Plasmazelle. Fixierung Susa, Färbung Cardos.



Abbildung 157
Plasmazellen um zwei Tumorzellen aus einem Benzpyren-Tumor der Ratte. Sie enthalten zum Teil noch Vacuolen. Fixierung Susa, Färbung Cardos.

Landsberger (1962) hat – fußend auf solchen und eigenen Beobachtungen – den in Mastzellen vorkommenden Mucopolysaccharid-Polyschwefelsäureester (M-P-Ester) Ratten mit Benzpyren-Tumoren intra- und para-tumoral injiziert und dadurch Rückbildung von Tumoren erzielt. Mäusen, denen er Ascites-Zellen mit verdünntem M-P-Ester intraperitoneal injizierte, bekamen überhaupt keinen Ascites, während alle Kontrolltiere zur üblichen Zeit starben.

Nachdem durch diese Untersuchungen erneut die entscheidende Rolle des R.E.S. bei der Abwehr von Geschwülsten bewiesen war, wurde die Frage bearbeitet, ob eine Aktivierung des R.E.S. durch Zellen möglich ist.

Durch Arbeiten Kments (1960-61) ist bewiesen worden, daß der «Revitalisierung» (Niehans) exakt meßbare Veränderungen in vielen Geweben zugrunde liegen.

Eine solche Auffrischung des Körpers durch Placenta- oder Testis-Zellen war auch für eine Krebs-Behandlung wichtig. Daß Placenta-Zellen überdies hemmend auf das Wachstum von Geschwülsten wirken, ist oft gesagt worden (Kludas 1957). Uns lag aber in erster Linie daran, das R. E. S. zu aktivieren, das heißt zu stärkster Bildung von Lymphocyten, Histiocyten, Plasma- und Mast-Zellen anzuregen.

Aus den Arbeiten von Andres (1959), Neumann (1958 und 1959), P. Weiss und Taylor (1960) u. a. sowie aus eigenen Arbeiten war bekannt, daß die Milz und das gesamte R. E. S. auf Milz-Zellen-Implantationen spezifisch reagieren.

Über diese Versuche ist mehrfach berichtet worden.

Der erste Versuch, der zu weiteren Experimenten ermutigte, war folgender:

Erwachsene Ratten gleichen Geschlechts erhielten 5 mg Benzpyren gelöst in ol. arachidis, subcutan. Vier Wochen danach – als eine Geschwulst noch nicht zu fühlen war – erhielten die Tiere die erste intraperitoneale Implantation von Thymus-Trockenzellen vom Kalb (Siccacell). Es folgte eine weitere Implantation nach etwa drei Wochen, dann nach drei Monaten und noch zweimal nach etwa je vier Wochen. Nach 167 Tagen waren 81,25% der unbehandelten und 46% der behandelten Tiere gestorben. 3,12% der unbehandelten und 10,5% der behandelten Tiere hatten keine

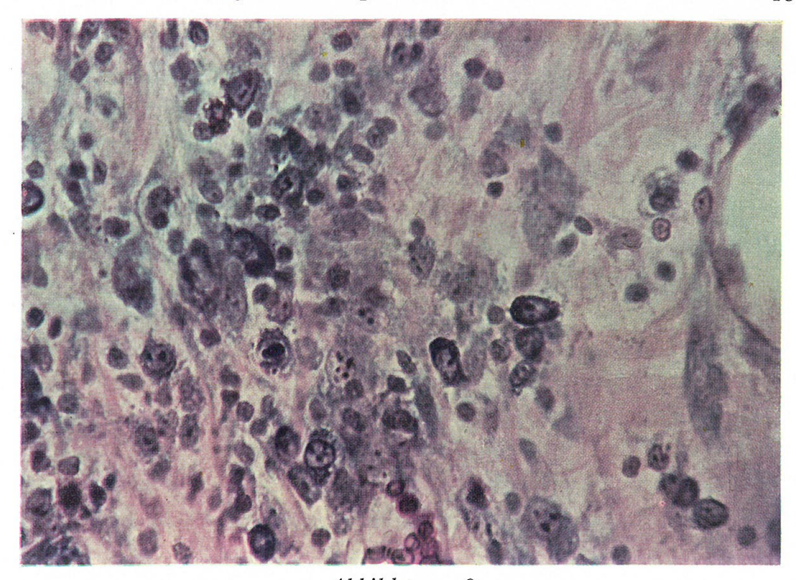


Abbildung 158

Erste Tumorzellen nach einer Benzpyren-Impfung. Die basophilen großen Tumorzellen sind von kleinen Lymphocyten und Plasmazellen umgeben, die sie vernichten. Fixierung Susa, Färbung Cardos.

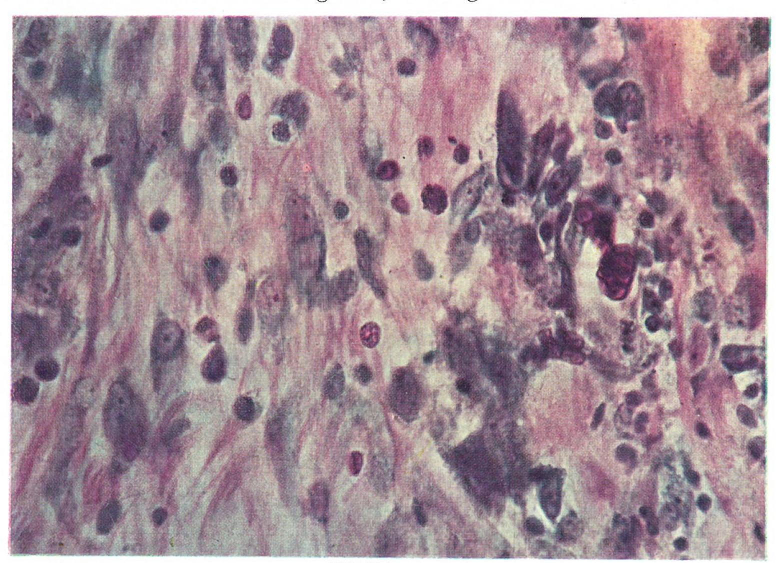


Abbildung 159

Dasselbe.

Geschwulst. Dann wurde mit den Implantationen ausgesetzt. Die bisher deutlich sichtbaren Unterschiede verschwanden. Die Behandlung mit Milz-Trockenzellen hatte ein etwas besseres Ergebnis. Nach 167 Tagen waren bei 16,5 % der behandelten und bei 3,12 % der Kontrolltiere die Tumoren noch nicht angegangen. Diese Versuche zeigten, daß mehrfache Trockenzell-Implantationen gut vertragen wurden und daß häufige Implantationen nötig waren, um einen Erfolg zu erzielen. Wie die histologischen Untersuchungen zeigten, wurde das gesamte R. E. S. aktiviert und – wohl als Folge davon – das Wachstum der Geschwülste deutlich gehemmt.

Viel deutlicher war die Wirkung der Implantationen bei 40 Ratten, die wiederum mit 5 mg Benzpyren subcutan geimpft worden waren. Sie hatten, erstmalig 16 Tage nach der Impfung, 0,15 g Milz-Frischzellen von Ratten erhalten, denen zwei Wochen vorher ein Walker-Tumor übertragen worden war. Deren Milz war also aktiviert, wenn auch nicht durch einen Benzpyren-Tumor. Im ganzen wurden 13mal Frischzellen implantiert. Nach 205 Tagen waren 83,3 % der Kontrolltiere und 58,5 % der behandelten Tiere gestorben, 2,8 % der unbehandelten und 35 % der behandelten Tiere hatten noch keine Geschwulst entwickelt. Nach 253 Tagen hatten alle Tiere eine Geschwulst. Es lebten noch 32,5 % der behandelten und 2,8 % der unbehandelten Tiere.

Das beste Ergebnis zeigten in gleicher Weise mit Benzpyren geimpfte Ratten, die erst behandelt worden waren mit 0,34 g Thymus-Frischzellen von 4 Wochen alten Kaninchen und später von fetalem Schafs-Thymus (Hoepke und Fluhr 1955). Im ganzen wurde 10 mal implantiert. Nach 126 Tagen waren 38,8 % der unbehandelten und 91,1 % der behandelten Tiere frei von Tumoren. Nach 220 Tagen aber hatten alle unbehandelten Tiere eine Geschwulst, während 84 % der behandelten Tiere davon frei waren. Es lebten noch 88,8 % gegen 11,2 % der Tiere.

In diesem Versuch wurden Frischzellen von vier Wochen alten Tieren benutzt, weil von Zellen eines bereits aktivierten Organs eine bessere Wirkung zu erwarten war.

Das war offenbar richtig, denn es war in diesem Versuch gelungen, bei 84 % der Tiere das Angehen der Geschwulst ganz zu unterdrücken.

Bei allen mit Trocken- oder Frisch-Zellen behandelten Tieren

war die Milz aktiviert. In bestimmten Bezirken der Geschwülste fanden sich immer kleine Lymphocyten, Mast- und Plasma-Zellen.

Leider fielen andere Versuche nicht so günstig, manche geradezu schlecht aus. Darüber wurde bereits berichtet (HOEPKE 1960 und 1962). Nach zahlreichen Versuchen läßt sich heute sagen, daß durch Zellular-Therapie das R. E. S. stark aktiviert wird. Durch Zellinjektionen kann aber das Angehen einer Geschwulst nicht in allen Fällen verhindert werden. Die Rückbildung eines schon bedeutend entwickelten Tumors kann ebenfalls nicht mit Sicherheit erreicht werden. Wenn eine Geschwulst bei der Ratte einmal die Größe einer Kirsche erreicht hat, ist ihr Wachstum im allgemeinen nicht mehr aufzuhalten. Metastasen treten allerdings auch dann nur selten auf.

Inzwischen sind bereits Krebskranke mit Frischzellen von Hoden, Ovar, Placenta, Knochenmark und Milz behandelt worden, um «die biologischen Abwehrkräfte zu mobilisieren» (NIEHANS 1954). NIEHANS hat auch versucht, «nicht operierbare und der Röntgen-Behandlung trotzende Krebstumoren durch Revitalisierung günstig zu beeinflussen». Es konnten klinisch und durch Röntgenkontrolle Erfolge festgestellt werden. Die Geschwulst selbst konnte zwar nicht beseitigt werden. Das war aber auch nicht zu erwarten, da die Kranken erst im letzten Stadium der Erkrankung mit Zellinjektionen behandelt wurden.

NIEHANS (1954) hat weit über tausend Männer und tausend Frauen revitalisiert. Sie blieben, obwohl sie im krebsgefährdeten Alter standen, nach Mitteilung von NIEHANS bisher vom Krebs verschont. Das ist gewiß kein Beweis für die antiblastische Wirkung bestimmter Zellen, aber eine klinische Erfahrung, der nachgegangen werden sollte.

Wir haben uns natürlich die Frage vorgelegt, worauf die Unterschiede in unseren Ergebnissen beruhen. Auf Grund von Beobachtungen an vielen Hunderten von Tieren sind wir zu folgenden Ansichten gelangt:

1. Die nicht immer gleiche Konstitution der Versuchstiere und die stets verschiedene Aktivität der Tumoren beeinflussen jedes Ergebnis. Auch das R. E. S. von Mensch und Tier ist nicht immer gleich leistungsfähig, die biologischen Voraussetzungen sind meist verschieden.

2. Die Benzpyren-Dosis von 5 mg war zu hoch. Der Tumor wuchs zu schnell, das Gift wurde zu langsam ausgeschieden. Wir injizieren deshalb nur noch 2 mg.

3. Wir haben zu früh mit der Implantation von Zellen begonnen. Solange Entzündung und Resorption andauern, können die Zellen nicht voll wirken. Es kann dann sogar das Gegenteil eintreten, die Geschwulst besonders rasch wachsen. Das hat auch RIETSCHEL (1953) einmal am Menschen beobachtet.

Deshalb implantieren wir jetzt erst, wenn die Geschwulst mindestens erbsengroß ist. Das ist nach etwa 3–4 Monaten der Fall. Um sicher zu gehen, hat LANDSBERGER (1962) vor und nach jeder Implantation 1 mg Prednison injiziert. Es wirkt entzündungshemmend und soll überdies antiblastische und antiallergische Wirkungen haben.

4. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß Trockenzellen von Tieren, die bereits gelebt und ihr R. E. S. beansprucht haben, wirksamer sind als fetale Zellen. Vielleicht wird das R. E. S. der Ratten durch Milz-Trockenzellen von Allesfressern stärker aktiviert als durch solche von Pflanzenfressern. Auch das ist bei den laufenden Versuchen berücksichtigt worden.

5. Für das Allgemeinbefinden der Versuchstiere war die Implantation von Nabelschnur-Trockenzellen besonders gut.

6. Versuche an Geschwulst-Ratten haben gezeigt, daß das Tumor-Wachstum durch saure Ernährung deutlich gehemmt wird (HOEPKE und SCHEPELMANN 1960).

Wenn in weiteren Versuchen alle diese Punkte berücksichtigt werden, sind bessere, vor allem gleichmäßigere Ergebnisse zu erhoffen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit Zell-Implantationen deutliche, wenn auch noch wechselnde Erfolge erzielt werden können. Es ist in jedem Fall gelungen, das R. E. S. zu aktivieren. Die in ihm gebildeten Zellen: Lymphocyten, Mast- und Plasma-Zellen schädigen Geschwulst-Zellen. Soweit sich überblicken läßt, reichen aber Zell-Implantationen allein noch nicht aus, um in jedem Falle das Wachstum einer Geschwulst zu unterdrücken. Man wird wohl diese Therapie mit einer anderen verbinden müssen. Die letzten Arbeiten LANDSBERGERS (1962) zeigen einen neuen, sehr aussichtsreichen Weg.

Die Wirkung von Mastzellensubstanzen auf das Tumorwachstum

VON DR. A. LANDSBERGER, HEIDELBERG

Untersuchungen über die Zellulartherapie (LANDSBERGER 1962) tierexperimenteller bösartiger Tumoren haben erwiesen, daß die Injektion von Milz- und Placenta-Trockenzellen nur geringe Erfolge zeigt. In einer eigenen Versuchsserie wurde bei einigen Tieren ein verzögertes Wachstum des experimentell erzeugten Benzpyren-Sarkoms beobachtet. Histologisch fand sich eine Vermehrung von Gewebemastzellen in den Tumoren (LANDSBERGER 1962). Es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß diese Zellen eine Abwehr-Funktion (HOEPKE 1959) ausüben, die im wesentlichen – wie spätere Versuche zeigten – dem Heparin, oder einer chemisch weitgehend identischen Substanz zugeschrieben werden kann. Untersuchungen haben ergeben, daß Heparin in den Granula der Mastzellen enthalten ist. Über Heparinwirkung und über Mastzellen liegen eine Reihe von Veröffentlichungen vor. (HOLMGREN und WILANDER 1937; JORPES, HOLMGREN und WILANDER 1937; HOLMGREN 1940; CRAMER und SIMPSON 1944; OLIVER, BLOOM und MANGIERI 1947; EHRICH, SEIFTER, ALBURN und BEGANY 1949; FRIBERG, GRAF und ABERG 1951; RILEY und WEST 1953; ASBOE-HANSEN 1954; Lit.: KEIL 1954; ASBOE-HANSEN und ZACHARIAE 1955; RILEY 1958; LENNERT und SCHUBERT 1959; LENNERT 1961; LANDSBERGER 1962 und andere.)

1. Versuch

40 weibliche weiße Ratten erhielten je 5 mg 3,4-Benzpyren subcutan an der rechten Bauchseite injiziert. Nach sechs Wochen waren bei allen Tieren am Injektionsort linsen- bis bohnengroße Tumoren zu tasten. Für die Versuche wurden die Tiere in Gruppen zu je 20 eingeteilt. Die Behandlung begann 40 Tage nach Entwicklung des Tumors. Bei den Ratten der Kontrollgruppe hatten die Tumoren Kirschgröße noch nicht erreicht. Die Tiere der anderen Gruppe, die mit einem Heparinoid und Dextran behandelt wurden, hatten erbsen- bis kirschgroße Tumoren. Die Kombination mit dem Dex-

tran diente der Erhöhung der Phagocytose-Aktivität. Das Heparinoid wurde täglich intratumoral injiziert, je nach Tumorgröße 1 000 bis 2 000 IE. Die Tiere erhielten Dextran jeweils im Abstand von vier Tagen in einer Dosis von 0,5 bis 1 cm^3 (s. c.). Am 60. Tag der Behandlung zeigte sich folgendes Bild: Bei zwölf Tieren waren die Tumoren nicht mehr gewachsen, bei sechs bildeten sie sich zurück. Ein Tier wurde getötet. Die Untersuchung ergab folgenden Befund: In der Umgebung der Geschwulst ein ausgedehntes Hämatom, der Tumor selbst weich und bröcklig; Peritoneum unverletzt, Organe regelrecht, lediglich die Milz leicht vergrößert. Histologische Diagnose: Struktur des Tumors nicht mehr zu erkennen, vereinzelt Kerntrümmer, Bild einer totalen Nekrose.

In der Gruppe der Kontrolltiere mußten sieben getötet werden, da die Tumoren Zitronengröße erreicht hatten. Ein achtes Tier verstarb durch infiltratives Wachstum; die übrigen hatten zum Teil hühnereigroße Geschwülste.

2. Versuch

Einer weißen Maus mit einem 8 Tage alten Ascites (Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom) wurden 4 cm^3 Flüssigkeit durch intraperitoneale Punktion entnommen und auf zwei Reagenzgläser gleichmäßig verteilt. Dem Ascites-Tumor in dem einen Glas (I) wurden 2 cm^3 Mäuse-Ringer-Lösung[1] zugesetzt, zu dem des anderen (II) 2 cm^3 Heparinoid. Beide Reagenzgläser kamen anschließend 14 Stunden in den Brutschrank bei 37°. Die zuvor in der Zählkammer (nach NEUBAUER) ermittelte Anzahl der Zellen ergab einen Ascites mit etwa 80 Millionen Tumorzellen im cm^3. Der Null-Ausstrich zeigte hauptsächlich Ruhezellen in einer Größenordnung von 10 bis 20 μ, nur bis zu 4% befanden sich im Mitosestadium. Bei fast allen Zellen konnten Vacuolen im Cytoplasma beobachtet werden, die stets in der Mehrzahl auftraten.

Der Ausstrich der beiden Lösungen zeigte nach 14 Stunden auffällige Unterschiede.

Der Versuch wurde mit 40 weißen, weiblichen, gleichaltrigen Mäusen durchgeführt (Mäusestamm NMRI-Virus Inst. Tübingen). 20 Tiere erhielten je 0,2 ml der Lösung I und 20 Tiere je 0,2 ml der

[1] Mäuse-Ringer-Lösung = Ringerlösung + 2 Teile Aqua bidest.

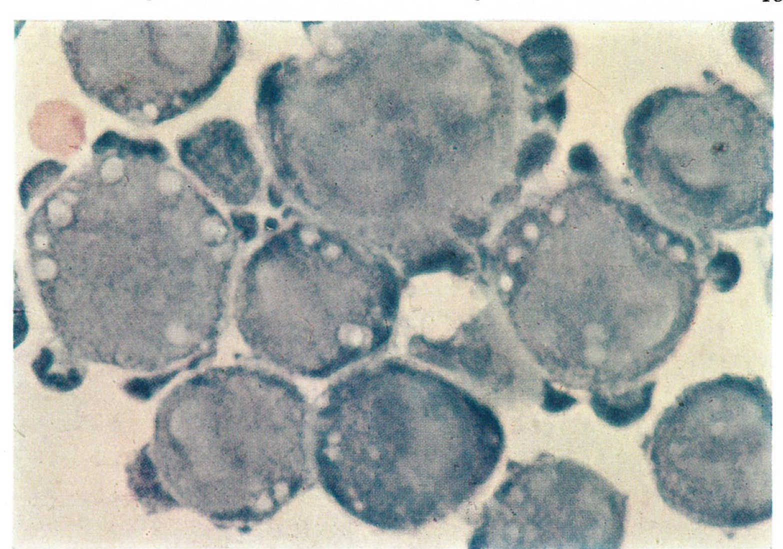


Abbildung 160
Der durch Mäuse-Ringer-Lösung 14 Stunden beeinflußte Ascites zeigt keine Veränderungen der Zellstruktur gegenüber dem unbeeinflußten. Färbung: Panchrom Pappenheim. Vergrößerung: 1400 ×.

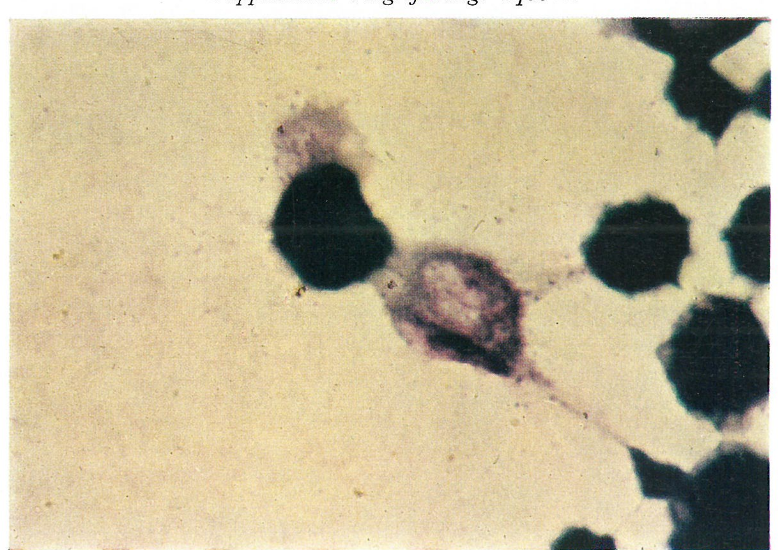


Abbildung 161
Ascites nach 14stündiger Heparinoid-Einwirkung. Fast völlige Zerstörung des Protoplasmas, schwere Kernschädigung, Metachromasie. Färbung: Panchrom Pappenheim. Vergrößerung: 1400 ×.

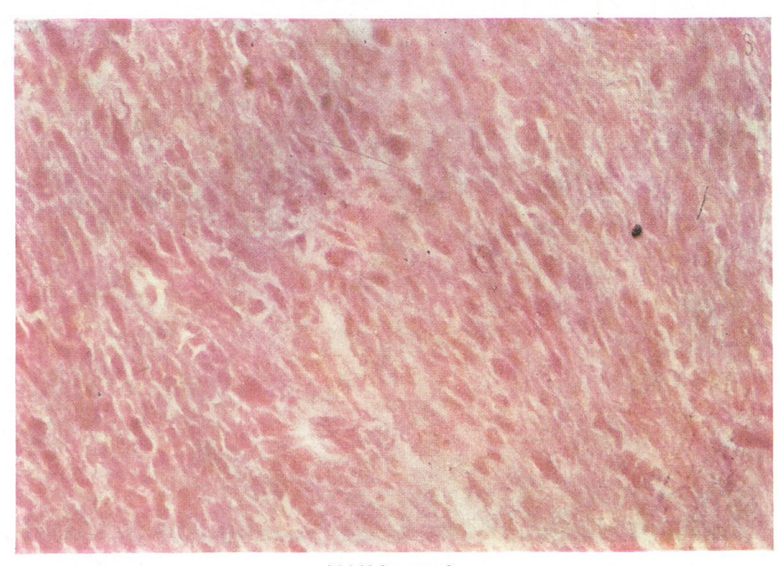


Abbildung 162

15stündige Heparin-Einwirkung in vitro auf ein Benzpyren-Sarkom. Bild einer totalen Nekrose. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 200 ×.

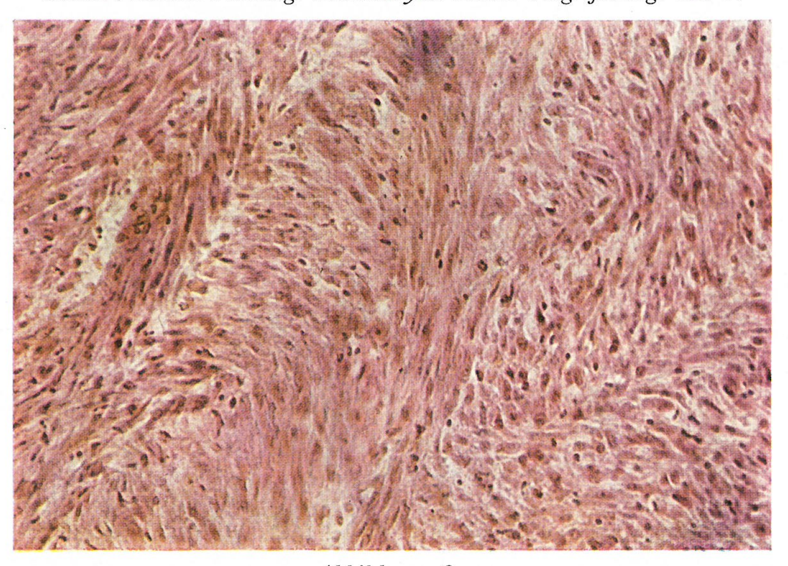


Abbildung 163

15stündige Trenimon-Einwirkung in vitro auf ein Benzpyren-Sarkom. Struktur des Tumors erhalten, vereinzelt Kernschädigungen. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 200 ×.

Lösung II intraperitoneal injiziert unter sterilen Bedingungen. Eine Stunde später erhielt jede Maus je 3000 IE Penicillin i. p. appliziert, um eine Infektionsgefahr zu mindern. Das Penicillin hat auf den Ascites-Tumor keinen Einfluß (LETTRÉ 1960).

Dieser Befund bestätigte sich im folgenden Tierversuch. Die Kontrollmäuse verstarben alle in der Zeit vom 10. bis zum 23. Tage nach der Impfung. Die Sektion ergab in allen Fällen einen zellreichen Ascites; die Zellzahl schwankte zwischen 80 und 120 Millionen. Parallel dazu wurde ein zum Teil massives Wachstum des Tumors in den Mesenterialduplikaturen beobachtet. Bei denjenigen Mäusen, die nach dem 16. Tag starben, war der Ascites meist hämorrhagisch. Im Ausstrich wurde bei der überwiegenden Mehrzahl der Tumorzellen die schon oben beschriebene cytoplastische Vacuolisierung gesehen.

Alle Tiere, die mit der Lösung II geimpft wurden (Ascites-Tumor und Heparinoid), lebten noch am 120. Tag nach der Injektion, ohne daß die Spur eines Ascites beobachtet werden kann. Die Mäuse werden weiter beobachtet, um festzustellen, ob der Tumor verspätet angeht oder völlig unterdrückt worden ist. In einer vorangegangenen Versuchsreihe wurde ebenfalls an Mäusen ein anderes Heparinoid getestet. Die Anordnung des Experiments glich dem oben beschriebenen nur mit dem Unterschied, daß das Heparinoid nicht 14, sondern nur 8 Stunden einwirkte. Das Tumorwachstum konnte nicht unterdrückt, wohl aber verzögert werden. Kein Kontrolltier überlebte den vierzehnten Tag. Diejenigen Mäuse, die mit Ascites geimpft wurden, auf den zuvor das Heparinoid 8 Stunden einwirkte, starben bis zum 24. Tage. Bei allen Versuchen ist nicht Heparin, sondern Heparinoid verwendet worden, weil ersteres die Gerinnungszeit stärker verzögert, was bei der geringen Blutmenge der Tiere tödliche Blutungen zur Folge hätte. Aus vorausgegangenen Testserien wurde diese Komplikation bestätigt.

Diskussion

Vor Beginn dieser Versuche sind mehrere Substanzen in vitro auf ihre Tumorwirksamkeit am Benzpyren-Sarkom und Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom erprobt worden: das Heparin, drei Heparinoide und zwei Cytostatica (Trenimon und Endoxan). Das Heparin und die Heparinoide zeigten sich den Cytostatica in der antiblastischen

Wirkung hoch überlegen. Heparin und Heparinoide haben auch nicht den toxischen Effekt der Cytostatica auf die hämatopoetischen Zentren, der in einem Tierversuch beobachtet werden konnte (LANDSBERGER 1962).

Die Ergebnisse dieses Testes und die des oben beschriebenen Versuches im Zusammenhang mit den Beobachtungen an der Mastzelle im Tumorgewebe scheinen die Vermutung zu bestätigen, daß das Heparin Tumorzellen inaktiviert. Wo das Heparin an der Geschwulstzelle angreift, konnte durch diese Versuche nicht geklärt werden; diese Fragestellung ist späteren Experimenten vorbehalten. Auffallend ist jedoch, daß die Vacuolen im Cytoplasma der Zellen des Ascites-Carcinoms nach Heparin-Einwirkung nicht mehr zu sehen sind, was zu der Annahme berechtigt, daß die Vacuolisierung ein Ausdruck der Aktivität dieser Tumorzellen sein kann. Der Versuch scheint diese Annahme zu begründen, doch müssen noch weitere Untersuchungen über diesen Gegenstand folgen, ehe diese Befunde als gesichert angesehen werden können.

In einer Versuchsserie, die der beschriebenen parallel lief, wurden Sarkomratten mit Nabelschnur-Zellen behandelt (subcutane Injektion von 6–8 mg Mesenchymzellen in Ringerlösung aufgeschwemmt, alle 8 Tage). Der Allgemeinzustand dieser Tiere war wesentlich besser, als bei den Kontrolltieren und bei den Tieren, die mit einem Heparinoid behandelt wurden. Das Heparinoid entfaltet bei den Tumorratten zwar eine deutliche antiblastische Wirkung, beeinträchtigt aber den Allgemeinzustand der Tiere durch Mikroblutungen, die auch bei vorsichtiger Dosierung nicht ganz zu vermeiden sind. Diese erhöhte Blutungsneigung belastet das hämatopoetische System. Histologisch zeigt sich das in einer extramedullären Hämatopoese in der Milz.

Die Mesenchymzellen aus der Nabelschnur haben zwar nicht eine so ausgesprochene antiblastische Wirkung wie Heparin oder Heparinoide, aktivieren aber offensichtlich das Reticulo-histiocytäre-System und unterstützen damit die körpereigene Tumorabwehr.

Es lag nahe, auf Grund dieser Resultate Tumortiere mit der Kombination von Heparin, bzw. Heparinoiden und Mesenchymzellen zu behandeln. Diese Versuche laufen zur Zeit.

Zusammenfassung

40 gleichgeschlechtliche weiße Mäuse vom selben Stamm wurden mit je 0,2 ml Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom, der von einer einzigen Maus stammte, geimpft. Der entnommene Ascites wurde vor der Überimpfung 14 Stunden im Brutschrank bei 37° C gehalten. Der einen Hälfte des Ascites (2 cm³) wurden zuvor 2 cm³ Mäuse-Ringer-Lösung, der anderen Hälfte 2 cm³ Heparinoid zugesetzt. Die Kontrolltiere verstarben bis zum 23. Tage, die mit Ascites-Tumor und Heparinoid geimpften lebten noch am 120. Tag, ohne Ascites-Bildung. Wirkte das Heparinoid nur acht Stunpen auf das Ascites-Carcinom ein, so verzögerte sich das Tumorwachstum, konnte jedoch nicht unterdrückt werden.

Für die Versuche wurden verwendet: Siccacell-Präparate der Firma Rhein-Chemie, die Heparinoide «Eleparon» (Luitpold-Werk, München) und G 31150 (Geigy AG, Basel), das Heparin «Liquemin» (Hoffmann-La Roche, Grenzach) und das Dextran «Makrodex» (Knoll AG, Ludwigshafen).



Einflüsse auf Strahlenschäden

Die Implantation hämatopoetischer Gewebe als Therapie der Strahlenschäden

VON DR. MED. J. STEIN, HEIDELBERG

Ein neues Anwendungsgebiet für die Therapie mit Geweben ergab sich aus der zunehmenden Strahleneinwirkung, der die Menschheit heute ausgesetzt ist. Bei der akuten und chronischen Strahlenkrankheit hat sich die Überpflanzung von hämatopoetischen Geweben als eine Behandlungsart erwiesen, die weit mehr leistet als die bisherige, mehr oder weniger symptomatische Therapie. Durch die Injektionsimplantation blutbildender Stammzellen eröffnet sich ein Weg, die Folgen einer hochdosierten Strahlung auf den gesamten Körper zu beheben.

Seit Entdeckung der Gammastrahlen durch RÖNTGEN (1895) kannte man zwar die Schädigungen durch *lokale* Einwirkung dieser ionisierenden Strahlen. Über die Beeinträchtigung der Gesundheit durch hochdosierte Bestrahlung des *ganzen Körpers* wußte man aber bis vor kurzem noch wenig.

Therapeutische Ganzbestrahlungen wurden seit DESSAUERS Konzeption des «Röntgenbades» (1905) bei generalisierten malignen Erkrankungen gelegentlich versucht. Die Schädigungen des hämatopoetischen Systems durch diese Methode waren aber größer als der therapeutische Nutzen.

Die Entwicklung der Kernphysik und die Nutzanwendung in Forschung, Technik und bei der Konstruktion nuklearer Waffen haben dazu geführt, daß sich die Wissenschaft mit den *Folgen hochdosierter Ganzbestrahlungen* auseinandersetzen mußte.

Bald nach den Ereignissen von *Hiroshima* und *Nagasaki* begann man in den Atomforschungszentren der USA und Englands die Schädigungen durch Totalbestrahlung zu studieren und nach einer Therapie dieser Noxen zu suchen.

Das Verhalten des Säugetier-Organismus nach Einwirkung hoher Strahlendosen auf den ganzen Körper wurde vorwiegend an der Maus studiert, die ein gutes Modell für Strahlen-Experimente ist.

Die an der Maus beobachteten Reaktionen treten mit wenigen Abweichungen auch bei anderen Säugetieren und beim Menschen auf.

Die letale Dosis (LD) einer Ganzbestrahlung liegt bei der Maus im Bereich etwa zwischen 500 r und 900 r. Das heißt, 500 r ist die kleinste Dosis, die unter den Versuchstieren vereinzelt zum Tode führt und 900 r ist die Dosis, von der ab alle Tiere dem Strahlenschaden erliegen. Um die letale Wirkung der Strahlendosis exakt zu definieren, gibt man die Zahl der gestorbenen Tiere in Prozenten der Gesamtzahl der dem Versuch unterworfenen Tiere und dazu noch den Beobachtungszeitraum in Tagen an. LD 50/28 Tage bedeutet also, daß innerhalb 4 Wochen die Hälfte der Versuchstiere den Noxen der Ganzbestrahlung erlag, und LD 100/28 Tage, daß im gleichen Zeitraum alle Versuchstiere verendeten.

Die LD für den Menschen läßt sich nicht experimentell bestimmen, aber aus ungewollten Experimenten bei Laboratoriumsunfällen mit Atomreaktoren ist zu entnehmen, daß der letale Bereich der Strahlendosis beim Menschen etwa dem der Maus entspricht. Auch Art und Symptome der Ganzbestrahlungsschäden ähneln sich weitgehend.

Von individuellen Faktoren abhängend, liegt die tödliche Dosis einer Ganzbestrahlung beim Menschen zwischen 400 und 600 r. Die Auswirkungen einer Bestrahlung des ganzen Körpers sind anders und schwerer, als wenn nur ein Teil den Strahlen exponiert wurde. Eine einmalige Teilbestrahlung von 600 r löst nur eine Rötung der Haut über dem exponierten Gebiet aus (Haut-Erythemdosis). Die gleiche Strahlenmenge auf den ganzen Körper gegeben, wirkt tödlich, weil sie das empfindliche blutbildende System zerstört.

Man kennt heute in Abhängigkeit vom Dosisbereich drei Formen der Strahlenkrankheit:

1. das Knochenmarksyndrom («hämatologischer Strahlentod»);
2. das Darmsyndrom («gastrointestinale Form des Strahlentodes»);
3. das Syndrom des ZNS («neurologischer Strahlentod»).

Bislang ist nur das Knochenmarksyndrom therapeutisch zu beeinflussen. Darmsyndrom und Syndrom des ZNS, die beim Menschen und anderen Säugern im supraletalen Dosisgebiet von 1200

bis 10000 r entstehen, führen unweigerlich in kurzer Frist zum Tode.

Bei der Ratte tritt das Darmsyndrom bereits im letalen Dosisbereich unterhalb 1 000 r auf. Wie weit beim Menschen die Strahlendosen auseinanderliegen, die das Knochenmark- und das Darmsyndrom auslösen, ist noch nicht genau bekannt. Die Erfahrungen aus dem Reaktorunfall der jugoslawischen Atomforscher weisen darauf hin, daß beim Menschen das Darmsyndrom erst im Bereich zwischen 1 000 und 1 200 r auftritt.

Am empfindlichsten gegen eine Ganzbestrahlung sind die blutbildenden Organe. Die als Knochenmarksyndrom bezeichnete Schädigung des gesamten blutbildenden Systems ist gekennzeichnet durch destruktive Veränderungen in den Geweben der Hämatopoese und ein Sistieren aller Mitosen. Es kommt in zwei bis fünf Tagen zu einer Pancytopenie mit Anämie und hämorrhagischer Diathese. Die Destruktion des Knochenmarks setzt bereits wenige Stunden nach der Strahleneinwirkung ein. Zuerst werden die besonders strahlenempfindlichen unreifen, jugendlichen Zellen betroffen. Ausgereifte Blutzellen vertragen höhere Dosen. Pathologisch-anatomisch spielt sich eine serös-hämorrhagische Entzündung ab. Die zellbildenden Elemente gehen zugrunde, das Knochenmark erscheint leer und «entvölkert». Je nach Ausmaß des Strahlenschadens kann neben dem Gewebeabbau eine zunächst teilweise Regeneration einsetzen, die sich entweder wieder erschöpft oder aber allmählich in den Aufbau einer neuen Knochenmarkstruktur mit Reticulargerüst, Kapillaren und zunehmender Hämatopoese übergeht (STODTMEISTER und andere). Der kritische Zeitpunkt dieser Regeneration ist die zweite bis dritte Woche nach dem Strahlenschaden. Wenn es gelingt, diese Zeit durch therapeutische Maßnahmen zu überbrücken, so kann von dann ab die Restitution eintreten.

Während dieser Periode ist der Organismus in hohem Maße durch Infektionen gefährdet. Da die intensive Ganzbestrahlung das reife lymphatische Gewebe zerstört, erlischt auch die immunbiologische Abwehr. Die Versuchstiere gehen meist an einer Sepsis zugrunde. Mäuse, die einer Ganzbestrahlung von 800 r ausgesetzt waren, sterben – wenn sie nicht behandelt werden – in sieben bis vierzehn Tagen.

Die Therapie der Schäden infolge hochdosierter Ganzbestrahlung kann einsetzen:

1. *vor* der Bestrahlung;
2. *während* der Strahlenexposition;
3. *nach* der Strahleneinwirkung.

Zur prophylaktischen Anwendung *vor der Bestrahlung* wurden versucht: Injektionen von Fremdeiweiß (HEKTOEN 1918), Gaben von Oestrogenen (TREADERELL 1943 und PATT 1959), Aderlaß vor der Bestrahlung (JACOBSON 1949) sowie Injektion von chemischen Stoffen, wie zum Beispiel Cystein und Glutathion. Die Erfolge waren alles in allem gering. Prophylaktische Aktionen sind außerdem sinnlos bei Strahlenunfällen, die ja nicht voraussehbar sind.

Als Maßnahmen *während der Strahlenexposition* kann man mit einigem Vorteil eine künstliche Anoxie (BACQ 1951) versuchen, oder aber einzelne Körperteile oder Organe durch Blei abdecken. Letzteres ist zwar keine Ganzbestrahlung im strengen Sinne, aber die Versuche mit partieller Bleiabschirmung gaben Aufschluß über die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit einzelner Organe und Organsysteme.

Bei den Verfahren *post radiationem* erwies sich die Parabiose (BRECKER und CRONKITE, 1951) als wirkungsvoll. Unter Parabiose versteht man die chirurgische Vereinigung des Kreislaufs zweier Versuchstiere.

In diese Gruppe der Verfahren nach Strahleneinwirkung gehören ferner die intraabdominelle Implantation von Milzgewebe unbestrahlter Tiere und die – bei weitem erfolgreichste – Injektions-Implantation von Knochenmark, auf die noch ausführlich eingegangen wird.

Zur Implantations-Therapie der Strahlenschäden gelangte JACOBSON (1949) auf dem Wege über die Bleiabschirmung der Milz. Er verlagerte die bei der Maus chirurgisch leicht zu mobilisierende Milz außerhalb des Körpers und schützte sie dort durch eine Bleikapsel, während er das Tier der Totalbestrahlung aussetzte. Diese Bleiabschirmung der Milz erwies sich als wirksamer Strahlenschutz auch dann, wenn für die Dauer der Bestrahlung die Milz durch Abklemmen der Gefäße vom Kreislauf ausgeschaltet wurde. Die LD 50, die bei jungen, adulten Mäusen etwa 550 r betragen hatte, erhöhte sich durch den Bleischutz der Milz auf 1025 r. In der ge-

schützten Milz fand sich 48 Stunden nach der Bestrahlung eine gesteigerte ektopische Blutbildung. Der Schutzeffekt blieb auch dann erhalten, wenn bis zu sechs Stunden nach der Bestrahlung die mobilisierte und durch Blei abgeschirmte Milz exstirpiert wurde.

Bleischutz der teilweise mobilisierten Leber, des ektopierten Darmes, des ganzen Kopfes oder einer hinteren Extremität erhöhten ebenfalls die Überlebensrate der mit 1025 r bestrahlten Tiere – aber nicht so stark, wie der Schutz der Milz. Bleischutz einer Niere war ohne Wirkung. Es schien also darauf anzukommen, daß die geschützten Körperteile hämatopoetisches Gewebe enthielten oder wenigstens zur ektopischen Blutbildung fähig waren.

Von der Beobachtung ausgehend, daß aus kleinen Resten ungeschädigten hämatopoetischen Gewebes sich das gesamte blutbildende System regenerieren kann, unternahm JACOBSON (1951, 1952) Versuche mit Implantation von Milzgewebe in die Peritonealhöhle der bestrahlten Mäuse. Zunächst implantierte er die eigene Milz, die er dem Tier vor der Strahlenexposition operativ entfernt und vital konserviert hatte. Später implantierte er fremde Milzen von jungen und älteren unbestrahlten Tieren und erreichte auch damit einen Strahlenschutz. Am wirksamsten waren die Milzen frisch geborener Tiere.

Aus diesen Versuchsergebnissen zog JACOBSON den Schluß, daß der Strahlen-Schutzfaktor *humoraler* Natur sei. Er vermutete, daß die abgeschirmten Gewebe eine nicht zelluläre Substanz produzierten, die eine günstige Wirkung auf die Wiederherstellung hämatopoetischer Gewebe ausübe. In den folgenden Jahren wurde viel Mühe darauf verwandt, diesen humoralen Schutzfaktor zu isolieren und zu identifizieren. COLE (1953) trennte einzelne subzelluläre Fraktionen durch differentielles Zentrifugieren und untersuchte, wie weit sie gegen Strahlen schützten, wenn er sie intravenös injizierte. Mitochondrien, Mikrosomen oder lösliche Substanzen aus der überstehenden Flüssigkeit erwiesen sich als wirkungslos. Da ein gewisser – wenn auch nicht eindeutiger – Effekt durch die Kernfraktion ausgelöst wurde, vermutete COLE (1954) ein Nucleoprotein als Schutzfaktor, das er als Desoxyribonucleoprotein definieren zu können glaubte.

Im Gegensatz zu JACOBSON und seiner Arbeitsgruppe waren LORENZ (1951) und Mitarbeiter nicht davon überzeugt, daß der

Schutzfaktor nur humoralen Charakters sein könne. LORENZ hielt es auch für möglich, daß das Überleben der bestrahlten Tiere auf einer *Aussaat* und *Proliferation* der implantierten hämatopoetischen Zellen beruhen könne. Er griff die Versuche von REKERS (1948) wieder auf und injizierte mit 900 r ganzbestrahlten Mäusen frisches vitales Knochenmark, das er den langen Röhrenknochen junger, unbestrahlter Mäuse eines genetisch homogenen Stammes entnommen hatte.

Die Injektion der Zellsuspension erfolgte intraperitoneal und intravenös. Die Tiere vertrugen die Injektions-Implantation komplikationslos und hatten nach beiden Injektionsarten eine Überlebensrate von 75%. Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrolltieren zeigten diese mit Knochenmark implantierten Mäuse kaum ein Absinken ihrer Erythrocyten-Zahlen nach der Ganzbestrahlung. Eine leichte Leukopenie trat kurzfristig auf. Bereits am 5. Tage nach Injektion von Knochenmark stiegen die Leukocytenzahlen wieder an. Die gleichen Erfolge waren bei Meerschweinchen zu beobachten.

In der Leber der behandelten Tiere fand LORENZ kleine, aktive Bezirke hämatopoetischen Gewebes. Da Blutbildungsstätten normalerweise nicht in der Leber erwachsener bestrahlter Tiere vorkommen und bei den Kontrolltieren auch nicht gefunden wurden, nahm LORENZ an, daß dieses hämatopoetische Gewebe vom injizierten Knochenmark abstamme.

Nach intraperitonealer Injektion von Knochenmark fanden sich im Omentum majus ebenfalls kleine Gewebsinseln mit kräftiger Hämatopoese.

Die besten Erfolge wurden erzielt mit *isologem* Knochenmark[1]. Auch mit *homologem* Knochenmark waren die Erfolge noch gut. *Heterologe* Implantate zeigten ebenfalls einen Schutz, der aber weniger ausgeprägt war. Die LORENZschen Befunde wurden in den Jahren

[1] 1. Autologe Implantation: Re-Implantation des dem eigenen Körper entnommenen Gewebes.

2. Isologe Implantation: Überpflanzung zwischen Tieren eines Inzuchtstammes oder zwischen genetisch homogenen F-Hybriden.

3. Homologe Implantation: Überpflanzung zwischen Tieren verschiedener Inzuchtstämme, die aber zur gleichen Spezies gehören.

4. Heterologe Implantation: Überpflanzung zwischen Tieren verschiedener Spezies; zum Beispiel von Ratte auf Maus.

zwischen 1951 und 1956 von anderen Forschergruppen nachgeprüft und größtenteils bestätigt.

Obwohl die Ergebnisse der Knochenmarkimplantation in vieler Hinsicht für die Wirkung einer echten Überpflanzung mit Proliferation und spezifischer Funktion der Spenderzellen sprachen, glaubte man weiterhin an den Effekt eines humoralen, hormonartigen Faktors. Die Möglichkeit, daß implantierte, fremde Zellen «angehen» und sich im Wirtsorganismus vermehren könnten, schien unvereinbar mit den geltenden Ansichten über die Biologie und Immunologie der Transplantation.

Gerade in der Wirksamkeit heterologer Implantate sah man den Beweis für die humorale Natur des Strahlenschutzfaktors; denn es schien unmöglich, daß der Wirtsorganismus das Weiterleben, die Vermehrung und sogar eine Funktion der injizierten, artfremden Zellen tolerieren könne.

Es gab aber einige unvoreingenommene Wissenschaftler, die an die Auswirkung einer echten Überpflanzung lebender Zellen mit nachfolgender Proliferation glaubten. Sie konzentrierten ihre Bemühungen auf den Beweis dieser These (LORENZ 1952 und 1954, CONGDON 1954, BARNES und LOUTIT 1954).

Eine erste Bestätigung lag vor, als LINDSLEY und Mitarbeiter (1955) zeigen konnten, daß die roten Blutkörperchen des bestrahlten und anschließend mit fremdem Knochenmark implantierten Tieres vom gleichen Antigen-Typ waren, wie die des Spendertieres. Den endgültigen Beweis für das Vorliegen eines zellulären Faktors führte FORD (1956) durch ein Tierexperiment, mit dem es ihm gelang, die Zellen des Empfängertieres von den implantierten Zellen des Spendertieres zu unterscheiden.

Er reproduzierte die LORENZschen Versuche und bestätigte die protektive Wirkung einer injizierten Zellsuspension von frischem, jugendlichem Knochenmark gegen eine letale Röntgenbestrahlung von 950 r. Um über den Wirkungsmechanismus des injektionsimplantierten Knochenmarks Näheres zu erfahren, verwendete er den Mäusestamm CBA als Empfänger und den Stamm T6 als Knochenmarkspender. Der Mäusestamm T6 zeigt in seinem Chromosomensatz ein spezifisches Charakteristikum, so daß eine Art von Markierungschromosom gegeben war. Nach Bestrahlung mit 950 r ging das Knochenmark der CBA-Mäuse zugrunde. Wurden kurz nach

der Bestrahlung durch Injektion Knochenmarkzellen der Spendertiere vom Stamm T6 implantiert, so konnte man drei Wochen später beim Empfängertier vom Stamm CBA Zellen mit dem typischen Markierungschromosom der T6-Tiere im Metaphasenstadium der mitotischen Teilung nachweisen.

Das gleiche konnte erreicht werden durch Übertragung von Rattenknochenmark auf CBA-Mäuse. Die nach der Röntgenbestrahlung überlebenden CBA-Mäuse zeigten später typische Rattenchromosomen in mitotischer Teilung in den Zellen des Knochenmarks und der Milz. FORD bezeichnete dieses Phänomen als Bestrahlungschimäre (Radiation-Chimaera[1]).

Damit sollte ausgedrückt werden, daß in einem Tier Zellen zweier verschiedener Tierspecies nebeneinander vorkamen. Der Begriff der Bestrahlungschimäre ist nur anwendbar, wenn heterologes Knochenmark transplantiert wurde.

FORDS Experiment wurde durch Nachuntersucher bestätigt. Die Richtigkeit seiner Beobachtung wurde dann später noch durch andere Methoden der Beweisführung erhärtet:

a) mittels einer Technik der *Antigen-Bestimmung* wurden Erythrocyten der Ratte im strömenden Blut von Mäusen nachgewiesen, die mit letaler Dosis ganzbestrahlt und dann mit Rattenknochenmark behandelt waren (MAKINODAN 1956, Vos et al. 1956).
b) durch eine *histochemische Färbung* wurden Granulocyten der Ratte festgestellt in den Blutbildungsstätten und im peripheren Blut von Mäusen, die ebenfalls bestrahlt und intravenös mit Ratten-Knochenmark injiziert worden waren (NOWELL et al. 1956).
c) SMITH und seine Mitarbeiter (1957) demonstrierten, daß bei den Experimenten mit Zell-Übertragung von Ratte auf Maus sich die *Blutplättchen* der überlebenden Mäuse *antigen* wie Ratten-Thrombocyten verhielten.

Durch diese unterschiedlichen Versuchsanordnungen war mit zwingender Beweiskraft nachgewiesen, daß die Behandlung der Strahlenkrankheit durch parenterale Injektion lebenden, fremden Knochenmarks eine echte Zellüberpflanzung ist, das heißt, eine «Pfropfung»[2]) mit dem «Angehen» der implantierten Zellen,

[1] Chimäre: Fabelwesen der griechischen Mythologie mit einem Ziegenleib, dem Kopf eines Löwen und dem Hinterteil einer Schlange.

[2] Im einschlägigen angelsächsischen und französischen Schrifttum hat

ihrer Proliferation und Übernahme spezifischer Funktionen. Neuerdings wird dieser Vorgang auch als «Kolonisation» bezeichnet.

Die hämatopoetischen Zellen des Spenders bewirken eine *Repopulation* der durch Strahleneinwirkung untergegangenen Blutbildungsstätten des Empfängers. Dabei gelingt es mit einer einzigen intravenösen oder intraperitonealen Injektion von Stammzellen, das gesamte funktionelle Zellsystem mit seinen verschiedenen Zelltypen, wie Erythrocyten, Granulocyten und Thrombocyten zu übertragen.

Diese Erkenntnisse auf dem Gebiet radiobiologischer Forschung haben enge Beziehungen zu den bereits früher gewonnenen Erfahrungen mit der Zellulartherapie und entsprechen der NIEHANSschen Konzeption. NIEHANS hat seit 1931 frische, lebensfähige Zellen – später auch hämatopoetische Zellen aus Knochenmark und fetaler Leber – durch Injektionsimplantation übertragen und dadurch eine organspezifische Regeneration ausgelöst.

Die Radiobiologen haben nunmehr zeigen können – unter bestimmten Voraussetzungen – daß die injizierten Knochenmarkzellen des Spenders im Organismus des Empfängers zu ihren korrespondierenden Bildungsstätten «heimfinden» (to home), sich dort ansiedeln, vermehren und ihre spezifische Funktion übernehmen.

NIEHANS hat auf Grund seiner klinischen Beobachtungen die «Wanderung» von injizierten Zellen oder Zellteilen zum korrespondierenden Organ vermutet und als Arbeitshypothese zur Diskussion gestellt. LETTRÉ konnte später durch Versuche mit isotopenmarkierten Hirnzellen diese Theorie stützen. KUHN und KNÜCHEL führten in klinischen Versuchen durch die Bestimmung drüsentypischer Harnsteroid-Fraktionen den Nachweis der organspezifischen Wirkung parenteral injizierter Trockenzellen.

In der Zellulartherapie werden fast ausschließlich heterologe Zellen verwendet, weil homologe Gewebe nur selten zur Verfügung stehen. Den Kritikern der Zellulartherapie erschien es unglaubwürdig, daß artfremde Zellen den von NIEHANS behaupteten Organtropismus haben sollten. Die radiobiologischen Experimente

sich der Ausdruck «Pfropfung» (the graft; la greffe) eingebürgert. Da die Bezeichnung Pfropfung sachlich richtig ist und den Vorgang treffend charakterisiert, sollte sie auch in die deutsche Terminologie übernommen werden.

aber haben nunmehr bewiesen, daß unter gewissen Voraussetzungen die heterologen Zellen eines artfremden Spenders vom Empfänger toleriert und sogar «eingebaut» werden können.

Sicherlich dürfen die Ergebnisse der radiobiologischen Versuche nicht ohne weiteres zur Klärung des Wirkungsmechanismus der Zellulartherapie herangezogen werden. Bei den Strahlenexperimenten handelt es sich insofern um einen Sonderfall, als die normale immunbiologische Abwehr gegen das Hetero-Transplantat durch die Röntgen-Ganzbestrahlung ausgeschaltet ist.

Bei den Beobachtungen mit der Zellulartherapie fragt es sich allerdings, ob schwere chronische und degenerative Erkrankungen die immunbiologische Abwehr des Patienten nicht ebenfalls so weit abschwächen können, daß spezifische Effekte injektionsimplantierter Zellen möglich werden. Hier muß erneut an das sogenannte HALSTED-Prinzip erinnert werden. HALSTED wies 1910 im Zusammenhang mit der chirurgischen Transplantation ganzer Organe nach, daß immunbiologische Reaktionen um so geringer bleiben, je größer das Bedürfnis des kranken Körpers für das Transplantat ist.

Immunbiologische Probleme stehen bei der Injektions-Implantation homologer und heterologer Zellen im Vordergrund. Das implantierte Knochenmark kann nur wirksam werden, wenn vorher durch ausreichende Ganzbestrahlung die immunologische Abwehr des Empfängers außer Kraft gesetzt wurde. Es bedarf einer Strahlendosis aus dem letalen Bereich, die etwa um 1 000 r liegt, um den immunologischen Mechanismus weitgehend zu inaktivieren. Die Strahlenmenge darf jedoch noch nicht so groß sein, daß sie das irreparable Darmsyndrom auslöst.

Nach Röntgendosen von 550 bis 650 r bleiben Knochenmark-Injektionen ohne therapeutische Wirkung. Bei einer Dosierung von nur 450 bis 550 r hat das implantierte Knochenmark sogar einen ungünstigen Einfluß (VOS 1958).

Wenn die Bildung von Antikörpern im lymphatischen System des Wirts nicht durch die Bestrahlung ausgeschaltet wird, kann es – nach einer Latenzzeit von 80 bis 100 Tagen – zur sogenannten «Sekundär-Krankheit» kommen. Diese zweite Erkrankung ist keine unmittelbare Folge der Strahlennoxe, sondern beruht auf einer späten Antigen-Antikörperreaktion zwischen Implantat und Wirt.

Die Sekundärkrankheit beginnt mit Gewichtsverlust. Dann treten gehäufte Diarrhoen auf, die Haare fallen aus infolge einer atrophischen Dermatitis und die Tiere werden anfällig gegen bakterielle Infektionen, denen sie zum Teil erliegen.

Es steht heute fest, daß die Sekundärkrankheit immunbiologischer Natur ist, aber es ist noch nicht entschieden, welcher Mechanismus zugrunde liegt. Die Spätreaktion kann auf einer Antikörper-Produktion der Wirtszellen gegen die fremden Zellen des Implantats beruhen («Wirt-gegen-Implantat-Reaktion») (host versus graft). Es können aber auch die implantierten Zellen nicht nur als Antigen wirken, sondern infolge ihrer erhaltenen Vitalität aggressiv reagieren und selbst Antikörper gegen die als Antigen wirkenden Gewebe ihrer neuen Umgebung bilden («Implantat-gegen-Wirt-Reaktion») (graft versus host; MEDAWAR, BILLINGHAM, BRENT). Wahrscheinlich kommt beides vor. Wie dann die Reaktion abläuft, hängt davon ab, wieviel lymphatisches Gewebe des Empfängers noch intakt war, bzw. welche Menge lymphoblastischen Gewebes implantiert wurde. Auf jeden Fall beruhen die immunologischen Spätreaktionen nur auf der Aktivität des *lymphatischen* Gewebes. Das myeloische Gewebe ist an der Bildung von Antikörpern nicht beteiligt.

VOS, DE VRIES und VAN BEKKUM (1958) haben nachgewiesen, daß ein geringer Zusatz von homologen Lymphknotenzellen zum Implantat homologen Knochenmarks genügt, um den therapeutischen Effekt zu verhindern und die Empfängertiere nach sechs bis zwölf Tagen an einer Immun-Reaktion sterben zu lassen. Homologe Thymuszellen verhalten sich in dieser Hinsicht so wie die Zellen der Lymphknoten.

Hingegen zeigten Versuchstiere, die *isologes* Knochenmark erhalten haben, niemals die sekundäre immunologische «Runt-Krankheit», auch dann nicht, wenn isologe Zellen des lymphatischen Gewebes beigegeben wurden.

«Runt-Disease» ist die neue englische Bezeichnung für die immunbiologische Auseinandersetzung, die entsteht, wenn ein Implantat von sich aus den Wirtsorganismus immunologisch angreift. Das setzt voraus, daß die implantierten Zellen im Wirtsorganismus überlebten und daß der Wirt immuntolerant gegen das Implantat ist. «Runt» heißt im Englischen das Zwergrind. Die Übernahme dieses Wortes soll ausdrücken, daß die Runt-Krankheit durch

Kümmerwuchs gekennzeichnet ist. Es treten außerdem noch Haut- und Schleimhautsymptome, Durchfälle und Ernährungsstörungen auf. Der Immun-«Kampf», den man als «runting» bezeichnet, wurde bisher nur im Tierversuch beobachtet.

Nach Überpflanzung heterologen Knochenmarks, zum Beispiel von Ratte auf Maus, kann es – wenn die Tiere die Sekundärkrankheit überwinden – zu merkwürdigen Zellzusammensetzungen kommen. Folgende Zellkombinationen wurden nachgewiesen:

a) vollständiger und dauernder Ersatz des Mäuse-Knochenmarks durch das Knochenmark der Spender-Ratte;
b) das implantierte Rattenknochenmark verschwindet allmählich wieder und wird ersetzt durch das sich regenerierende Mäuseknochenmark. Solche Fälle werden als «total Revertierte» (total reversal) bezeichnet.
c) hämatopoetische Zellen der Ratte und der Maus existieren endgültig nebeneinander, so daß eine echte Strahlenchimäre entsteht. Die Chimärenbildung kann dabei so aussehen, daß zum Beispiel die Granulocyten sämtlich von der Ratte stammen und die Erythrocyten von der Maus.

Bei den Strahlen-Chimären betrifft die gegenseitige Toleranz zwischen Zellen zweier verschiedener Tierarten nicht nur das hämatopoetische Gewebe, sondern alle Zellen überhaupt. Die determinierenden Antigene sind demnach wohl allen Zellen eines Individuums eigen und spiegeln somit die genetische, chromosomale Konstitution wider. Das läßt sich zum Beispiel beweisen durch Hauttransplantationen. Bei Strahlenchimären zeigen die Empfänger auch eine definitive Toleranz gegen Hauttransplantate vom Spender.

Der Begriff der immunologischen Toleranz ist nicht neu. Die Toleranz war bereits bekannt als «freemantle»-Effekt der Rinder. Das «freemantle»-Rind entsteht, wenn im Mutterleibe placentare Gefäßanastomosen zwischen zwei Feten bestanden. Das ist auch bei diskordanten Zwillingen möglich. Der intrauterine Blutaustausch induziert eine gegenseitige Toleranz. Bei diesen Tieren können später Hautstücke oder ganze Organe kreuzweise transplantiert werden, ohne daß es zur Abstoßung kommt. Sind die «freemantle»-Geschwister verschiedenen Geschlechts, so können sexuelle Abnormitäten und Fortpflanzungs-Unfähigkeit resultieren.

Ein dem «freemantle»-Effekt entsprechender Befund wurde von DUNSFORD (1953) bei einer 25jährigen Frau erhoben. Als sie vor einer Blutspende auf ihre Blutgruppe getestet wurde, fand man gleichzeitig Gruppeneigenschaften für A und O. Von ihren roten Blutkörperchen gehörten 61% der Gruppe O an, und 39% der Gruppe A. Es stellte sich heraus, daß die Frau einen Zwillingsbruder gehabt hatte, der im Alter von drei Monaten an einer Pneumonie starb. Die Blut-Chimäre bei dieser Frau erklärte sich aus einer diaplacentaren Gefäßverbindung zwischen ihr und dem Zwillingsbruder. Der intrauterine Blutaustausch machte sie tolerant gegen die andere Blutgruppe. Die Blutzellen ihres verstorbenen Bruders lebten in ihr weiter.

MEDAWAR (1956) fand, daß man eine Toleranz induzieren kann, wenn man während des fetalen Lebens – solange die Immunreaktionen noch nicht entwickelt sind – das unreife Abwehrsystem des lymphatischen Gewebes einem antigenen Stimulus aussetzt. Er nannte dieses Phänomen «aktiv erworbene Toleranz» und definierte es als einen Zustand «von Indifferenz oder Nicht-Reaktivität gegenüber einer Substanz, die normalerweise eine immunologische Reaktion hervorruft».

Man darf diese im fetalen Leben aktiv erworbene Toleranz – die spezifisch nur gegen ein bestimmtes Antigen besteht – nicht ohne weiteres gleichsetzen mit der unspezifischen, allgemeinen Toleranz, die nach Ganzbestrahlung durch Ausschalten des gesamten immunbiologischen Abwehrsystems bewirkt wird. Während die im fetalen Leben erworbene Toleranz eine Reaktionsbereitschaft auf alle anderen Antigene erlaubt, bis auf dasjenige, mit dem die Induktion erfolgte, sind ganzbestrahlte und durch Knochenmark-Implantationen am Leben erhaltene Tiere immunbiologische Krüppel. Sie gewinnen nie wieder ihre volle immunbiologische Abwehrkraft zurück und bleiben daher immer infektgefährdet. Klinisch verhalten sie sich wie Individuen mit einer Agammaglobulinaemie oder Dysgammaglobulinaemie. Die Lymphknoten dieser Tiere weisen histologisch faßbare Mängel auf: es finden sich kaum Follikel und die wenigen vorhandenen sind nicht fähig, bei Infekten zu hyperplasieren. CONGDON und MAKINODAN (1958) zeigten, daß derartige Tiere auf einen antigenen Reiz nicht mehr mit einer normalen Antikörper-Reaktion zu antworten vermögen.

Eine Wiederherstellung der immunologischen Abwehr durch Implantation adulter Zellen der Milz oder des Lymphknotens ist – wie bereits erwähnt – nicht möglich, weil damit das ausgebildete Abwehrsystem dieser Zellen mitübertragen wird und sofort eine Immun-Reaktion gegen den Wirt beginnt (COSGROVE 1958).

FERREBEE (1957 und 1958) sieht die Lösung in der Verwendung *fetalen* Implantationsmaterials. Man kann undifferenziertes, omnipotentes Gewebe nehmen oder auch spezifisch lymphatisches Gewebe vom Feten. Nach UPHOFF (1958) sind diese unreifen lymphatischen Zellen fähig, aktiv eine Toleranz gegen die Gewebe-Antigene ihrer neuen Umgebung zu erwerben und dann ohne immunbiologische Komplikationen die strahlengeschädigten Lymphknoten und Milzfollikel des Wirtes wieder herzustellen.

Auch hier ist die Analogie zur NIEHANSschen Zellulartherapie gegeben. In der Zellulartherapie werden fetale Zellen bevorzugt, weil sie kaum allergisch-anaphylaktische Komplikationen verursachen. Nach KUHN und KNÜCHEL (1954) sowie ROTHER (1956) verhält sich das Eiweiß fetaler oder sehr junger Organismen hinsichtlich seines anaphylaktogenen Charakters anders, als das Zell-Eiweiß erwachsener Tiere. –

Anaphylaktische Zwischenfälle sind noch seltener, wenn gefriergetrocknete (lyophilisierte) Zellpräparate injiziert werden. Die antigene Potenz ist schwächer, weil bei Wiederdurchfeuchtung des gefriergetrockneten Zellmaterials weniger Eiweiß in Lösung geht, als bei Zubereitung von Frischzell-Suspensionen. Die Konservierung mittels Lyophilisation verändert auch nicht den Biochemismus des Zelleiweißes und der übrigen Zellinhaltsstoffe. Der Nativzustand ist bei gefriergetrockneten Zellen eher gewährleistet als bei direkt übertragenen Geweben, weil der Entnahme sofort die konservierende Tiefkühlung folgt.

Die Erfahrungen mit der Zellulartherapie haben gezeigt, daß gefriergetrocknete Zellpräparate die gleiche therapeutische Wirkung haben wie unmittelbar übertragene Frischzellen.

Es lag daher die Frage nahe, ob Strahlenschäden ebenfalls mit konservierten Knochenmarkzellen erfolgreich behandelt werden können.

Eine brauchbare Methode zur vitalen Konservierung von Zellen wurde 1949 von POLGE angegeben. Er konservierte Spermien unter

Tiefkühlung auf –80° in einem Glycerin-Serum-Medium. BARNES und LOUTIT haben 1955 nachgewiesen, daß mit dieser Methode auch Knochenmarkzellen über 83 Tage unter Erhaltung ihrer therapeutischen Aktivität gegen Strahlenschäden konserviert werden können.

Seit 1956 haben wir gefriergetrocknete Knochenmarkzellen in Strahlenversuchen an Mäusen erprobt. Die Erfolge mit einer intraperitonealen Injektion lyophilisierter, heterologer Knochenmarkzellen waren zunächst gering. Die bei diesen Versuchen applizierte Röntgen-Dosis von 440 bis 500 r hat allerdings nicht ausgereicht, um die immunbiologische Abwehr des Empfängers auszuschalten. SHULMAN, dem wir Trockenzellen des Knochenmarks und der Milz für Versuche zur Verfügung stellten, hatte bei Hamstern bessere Erfolge, weil er mit einer Ganzbestrahlung von 1 200 r experimentierte. Er erreichte nach intraperitonealer Injektion der Trockenzell-Präparate eine Überlebensrate von 60% über 30 Tage. Die überlebenden Tiere waren auch Monate später noch ohne Krankheitszeichen. Eine Sekundärkrankheit trat nicht auf – vermutlich weil die Trockenzellen vom Feten stammten.

Die Konservierung blutbildender Gewebe unter Erhaltung der therapeutischen Wirkung auf Strahlenschäden ist wichtig als Vorsorge für den Fall einer Katastrophe.

KLEINSORGE und MAY haben in systematischen Tierversuchen geprüft, ob durch die Injektionsimplantation lyophil getrockneten, isologen, homologen oder heterologen Knochenmarks ähnliche Therapieergebnisse resultieren, wie nach Verwendung von vitalem hämatopoetischem Gewebe. Weiße Mäuse des Inzuchtstammes AB wurden mit 800 r totalbestrahlt. Dieser Strahlendosis erlagen die Versuchstiere nach sechs bis dreizehn Tagen. Als Implantationsmaterial dienten:

1. Heterologe Trockenzellen aus fetalem Schafsknochenmark.
2. Isologe gefriergetrocknete Knochenmarkzellen von Mäusen des gleichen AB-Stammes.

Bei der Implantationsmenge wurde berücksichtigt, daß die für eine Schutzwirkung benötigte Zellzahl abhängig ist vom genetischen Verwandtschaftsverhältnis zwischen Spender und Wirt sowie von der Applikationsart. In Analogie zu den bei vorangegangenen radiologischen Tierexperimenten gewonnenen Erfahrungen

(JACOBSEN 1955, CONGDON 1957, BARNES und LOUTIT 1953, VOS und VAN BEKKUM 1958) wurden pro Maus gegeben bei *Heterologie* 150×10^6 Zellen = etwa 600 mg Trockenzellpräparat und bei *Isologie* $73{,}5 \times 10^5$ Zellen = 29 mg pro Maus. Die aus der Literatur bekannte Mindestmenge wurde zur Sicherheit verdoppelt.

Die Trockenzellsuspensionen wurden intraperitoneal ein bis zwei Stunden nach der Bestrahlung appliziert. Die für die Beurteilung des therapeutischen Erfolges herangezogenen Kriterien: Blutbildkontrolle, Gewichtskurve, Absterbeordnung und histologische Untersuchung ergaben keinen Anhalt, daß die implantierten heterologen oder isologen Knochenmark-Trockenzellen einen therapeutischen Effekt hatten.

Man könnte aus den Ergebnissen von KLEINSORGE und MAY schließen, daß durch Gefriertrocknung konservierte Knochenmarkzellen für Implantationsversuche nach Strahlenschäden ungeeignet seien, weil sie «tot» sind. Zellen, die nicht mehr «leben», sollen nach ERICKSON, MAIN und COLE zur Überpflanzung bei radiologischen Experimenten grundsätzlich nicht zu gebrauchen sein, weil sie nicht mehr die Voraussetzung für ein «Angehen», für eine «Kolonisation» mit sich bringen.

Hier stellt sich jedoch die Frage, ob die echte Pfropfung – das heißt die Ansiedlung und Vermehrung überpflanzter Zellen – in jedem Falle für den Therapieerfolg bei Strahlenschäden unerläßliche Voraussetzung ist. Möglicherweise genügt zur «Stimulation» noch vorhandener regenerationsfähiger Reste des Knochenmarks die Wirkung von Bestandteilen der Knochenmarkzelle, die als Zellbausteine zum Tragen kommen. Dieser Effekt wäre allerdings nur dann zu erwarten, wenn noch Reste funktionstüchtigen Gewebes vorhanden waren, auf die sich der regenerative Stimulus auswirken könnte. Dieser Teileffekt würde der von NIEHANS für die Zellulartherapie zur Diskussion gestellten Arbeitshypothese entsprechen, daß zugeführte Zellen abgebaut werden und ihr spezifisches Material als Bausteine zur Reparation des funktionell gestörten Organes verwendet wird.

KLEINSORGE und MAY haben betont, daß der ausbleibende Erfolg bei ihren Tierversuchen nicht beweise, daß gefriergetrocknete Zellen grundsätzlich ungeeignet seien. Da nach Erfahrungen amerikanischer und holländischer Radiobiologen sowie von LANGEN-

DORFF und Mitarbeitern (1958) feststeht, daß die Ergebnisse weitgehend von Eigenschaften der Versuchstiere abhängen, besteht die Möglichkeit, daß die von MAY und KLEINSORGE verwendeten Mäuse für solche Versuche ungeeignet waren. Eine Nachprüfung müßte noch erfolgen.

Es ist auch denkbar, daß bei den Versuchen von KLEINSORGE und MAY keine Reste hämatopoetischen Gewebes mehr vorhanden waren, von denen die Regeneration hätte ausgehen können. Es müßte also der Versuch wiederholt werden, unter Verwendung einer niedrigeren Dosis aus dem unteren Strahlenbereich der LD 100.

Es gibt bisher noch keine sicheren Anhaltspunkte dafür, daß auch mit *gefriergetrockneten* hämatopoetischen Zellen ein Schutzeffekt gegen Strahlenschäden erreicht werden kann. In Anbetracht der Bedeutung des Problems müssen die Versuche auf diesem Gebiet aber weitergeführt und vornehmlich darauf gerichtet werden, die Methoden der Konservierung zu vervollkommnen.

Die bisher referierten Ergebnisse beziehen sich auf Strahlenexperimente an Versuchstieren. Es erhebt sich die Frage, wie weit die gemachten Beobachtungen auch für den Menschen zutreffen. Ein Laboratoriumsunfall ergab die Möglichkeit, die Knochenmark-Implantation an strahlengeschädigten Menschen zu erproben.

Am 15. August 1958 wurden im Kernforschungszentrum von Vinca (Jugoslawien) durch einen Unfall mit einem Kernreaktor 6 Forscher einer Ganzbestrahlung mit Neutronen und Gammastrahlen ausgesetzt. Die Intensität der Bestrahlung war unterschiedlich, je nach der Entfernung zum Reaktor, in der sich die Forscher gerade aufgehalten hatten. Nachträglich ließ sich berechnen, daß 4 der Forscher einer letalen Dosis von etwa 700 bis 1000 r ausgesetzt waren, ein Forscher eine supraletale Dosis zwischen 1000 und 1200 r erhalten hatte und der 6. einer subletalen Dosis von etwa 300 bis 500 r exponiert gewesen war. Die Forscher wurden schon am nächsten Tage mit einem Flugzeug nach Paris in das Krankenhaus der Curie-Stiftung gebracht und dort behandelt (JAMMET, MATHE, SALMON 1959).

Der klinische Verlauf zeigte drei Phasen:

1. In der *initialen Schockphase*, die eine Stunde nach dem Unfall begann und über den 1. Tag anhielt, bestand ein allgemeines Alarmsyndrom mit Adynamie, Erbrechen, Paraesthesien und profusen Schweißen. Der am stärksten bestrahlte Forscher hatte außerdem noch Durchfälle.
2. Die danach folgende *Periode der Latenz* dauerte 2 bis 3 Wochen. Das Allgemeinbefinden war nicht wesentlich gestört, aber die Patienten

hatten Gewichtsverluste, eine allgemeine Schwäche mit Neigung zu profusen Schweißen, Schlaflosigkeit und quälende Kopfschmerzen. In dieser Periode zeigten sich auch Störungen am Blutbild, an der Haut und am Intestinaltrakt. Der mit supraletaler Dosis Bestrahlte hatte außerdem als Einziger am 14. und 15. Tag Fieberanfälle.

3. Im *Stadium der Krisis*, das von der 4. bis zur 7. Woche post irradiationem ablief, erfolgte ein schwerer allgemeiner Zusammenbruch der Gesundheit mit typhöser Benommenheit, Abnahme der Diurese, profusen Schweißen, Appetitlosigkeit und schwerster Nausea. Nur der mit subletaler Dosis von 300 bis 500 r bestrahlte Forscher zeigte diese Symptome nicht.

In dieser Periode hatten die Patienten eine Conjunctivitis, eine starke Austrocknung und ein Rissigwerden der Haut und vom 20. Tag ab einen fast vollständigen Haarverlust, der bei den männlichen Patienten auch den Bart betraf.

Das Magen-Darm-Syndrom äußerte sich in Schleimhautentzündungen der verschiedenen Darmabschnitte mit diffusen Schmerzen, Diarrhoen und den Symptomen des Subileus. Der am stärksten bestrahlte Patient wies im Verlauf der 4. Woche schwerste Darmsymptome mit einer Peritonitis und einem Occlusionsileus infolge zweier Invaginationen auf. Als eine sekundäre Anurie hinzukam, verstarb dieser Patient am 32. Tage.

Die männlichen Patienten zeigten von der 2. Woche ab einen Rückgang der Spermienzahlen und morphologische sowie funktionelle Änderungen der Spermien selbst. Bei der Schlußuntersuchung hatten zwei der Kranken eine Aspermie. Die einzige beteiligte Frau litt unter schweren Störungen der Menstruation mit ausgeprägten Menorrhagien.

Die schweren Strahlenschädigungen waren in ihrem Verlauf am besten am hämatologischen Syndrom zu verfolgen. Es bestanden gute Vergleichsmöglichkeiten, da Blutbilder aus der Zeit vor dem Unfall und vom Unfalltage vorlagen. Unmittelbar nach der Bestrahlung entwickelte sich eine Leukocytose zwischen 9000 bis 11000 mit beginnender Lymphopenie. In der Periode der Latenz folgte ein progressiver Schwund der einzelnen Blutzellarten. Die Lymphocyten waren am stärksten betroffen. Im Myelogramm fand sich eine Knochenmarkatrophie, die mit Beginn der 7. Woche in eine totale Aplasie überging. Gleichzeitig entwickelten sich Hämorrhagien an Zahnfleisch, Nasenschleimhaut, Magen und Darm. Im Thromboelastogramm waren schwere funktionelle Störungen der Thrombocyten zu erkennen. Die BKS war bis zum Ende der kritischen Periode beschleunigt.

Die Therapie bestand in allgemeinen Maßnahmen wie Schonkost, teilweise flüssiger Diät, Verabreichung von Vitaminkomplexen, Leber- und Nebennierenextrakten, Aminosäuren, vor allem Cystein und Lobamin. Die Patienten wurden isoliert gehalten, unter strenger Asepsis und Antisepsis, um Infektionen zu vermeiden. Antibiotica wurden nur im Bedarfsfalle und dann relativ sparsam gegeben.

Die spezifische Behandlung zur Beeinflussung der im Vordergrund stehenden hämatologischen Symptome erfolgte zunächst mit kleinen *Bluttransfusionen* von 150 cm³. Sie blieben ohne wesentlichen Erfolg und geschahen auch mehr in der Absicht, die häufigen diagnostischen Blutentnahmen zu kompensieren. Als sich die Prognose verschlechterte, wurde der Versuch mit einer *Injektionsimplantation hämatopoetischen Gewebes* gemacht. Um das Risiko einer sekundären immunbiologischen Reaktion zu mindern, wurde fetales, hämatopoetisches Gewebe aus der Leber eines menschlichen Feten gegeben. Es wurden etwa $4,2 \times 10^9$ fetale Leberzellen übertragen. Vielleicht war diese Menge zu gering. Es ist auch möglich, daß diese fetalen Zellen längere Zeit zum «Angehen» brauchten.

Aus der Zellulartherapie wissen wir, daß die Latenzzeit 2 bis 3 Wochen betragen kann, bis die fetalen Zellen wirksam werden. Eine Frist von 10 Tagen wird als Minimum angenommen. Jedenfalls zeigte die Injektion humanfetaler Leberzellen bei den strahlengeschädigten jugoslawischen Forschern keine eindeutige Wirkung.

Da die Prognose infaust zu werden begann, entschlossen sich die Ärzte des Curie-Hospitals zu einer *Injektions-Implantation adulter Knochenmarkzellen* von Spendern eines möglichst ähnlichen Blutgruppentyps. Das Knochenmark wurde dem Sternum entnommen und dem Empfänger intravenös injiziert. Es wurden zwischen 180 bis 300 cm³ Knochenmark implantiert. Die Zahl der damit übertragenen Zellen lag etwa zwischen $8,5$ bis 14×10^9.

Der Erfolg war hervorragend. Nach kurzem Transfusionsschock besserte sich der Gesamtzustand der moribunden Patienten. Unter Klärung des Sensoriums, Rückkehr der Dynamik und des Appetites nahmen die Patienten rasch an Gewicht zu und zeigten eine zunehmende Erholung des Blutbildes. Diese schlagartige Besserung entsprach der wiederhergestellten Funktion des hämatopoetischen Systems.

In Analogie zu den Tierversuchen von LORENZ, FORD und anderen kann mit größter Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich bei diesem Therapieerfolg um die Auswirkung einer echten Pfropfung mit einem «Angehen» der überpflanzten Zellen handelte.

Für die Annahme, daß die überpflanzten Knochenmarkzellen «angegangen» waren, gab es direkte und indirekte Beweise. Unter den indirekten Beweisen ist anzuführen die Plötzlichkeit, mit der nach Injektionsimplantation des adulten Knochenmarks die Blutwerte der Erythrocyten, Granulocyten und Thrombocyten – die ja selbst nicht implantiert wurden – anstiegen. Dieser Anstieg der Blutzellen myeloischer Herkunft wurde nur bei den Patienten beobachtet, die das Knochenmarkimplantat erhalten hatten. Dagegen

zeigte der Patient, der infolge der geringeren Bestrahlung von 300 bis 500 r keine Knochenmarküberpflanzung bekam, nur einen langsamen Anstieg der Blutzellwerte, ohne Reticulocytenkrise.

Den direkten Beweis dafür, daß das Knochenmarkimplantat angegangen war, brachten Untersuchungen mit der Differential-Agglutinationsmethode nach Ashby (1919), in der technischen Modifikation nach Wurmser (1954). Mit dieser Methode ist es möglich, durch Bestimmung der spezifischen Antigene der roten Blutkörperchen eine quantitative Trennung zwischen den Erythrocyten des Empfängers und des Spenders zu erzielen (Salmon 1959). Es wurde nachgewiesen, daß die Menge der Eigenantigene der Spender-Erythrocyten unmittelbar nach der Injektion anstieg, etwa nach 30 Tagen ein Maximum erreichte, um dann wieder abzufallen.

Die Kurve dieser Spenderantigene verlief in dieser Zeit parallel zur ebenfalls ansteigenden Antigenkonzentration der Empfänger-Erythrocyten. Daraus ging hervor, daß die Verbesserung der Erythropoese gebunden war an die Proliferation von Erythrocyten aus dem überpflanzten Knochenmark.

In einer zweiten Phase nahmen die aus dem Implantat stammenden Blutzellen wieder ab, während die Gesamtzahl der Erythrocyten einen erneuten Anstieg zeigte.

Es ist berechtigt anzunehmen, daß von diesem Augenblick an die Eigenproduktion von roten Blutkörperchen des Empfängers wieder aufgenommen wurde.

Zweifelsohne wurde das stark gefährdete Leben der vier jugoslawischen Forscher durch die Knochenmarkimplantation und durch das vorübergehende «Angehen» dieser Pfropfung gerettet. Während etwa eines Monats übernahm das Implantat die Produktion myeloischer Blutzellen und gab damit der eigenen Hämatopoese die Möglichkeit zur Erholung. Die bedrohliche Periode der zeitweisen Knochenmarkschädigung mit Funktionsparese wurde dadurch überbrückt.

In einer langfristigen Prognose des bemerkenswerten Therapieerfolges bei den jugoslawischen Atomforschern erhebt sich die Frage, ob bei ihnen das sekundäre immunbiologische Syndrom, die sogenannte Zweitkrankheit, eintreten könnte. Die Erfahrungen, die bei Mäusen mit diesem Sekundärsyndrom gemacht wurden, dürfen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden.

Es scheint, daß die Neigung zu immunologischer Späterkrankung nach heterologer Knochenmarkimplantation bei einzelnen Arten unterschiedlich ist. Bei Affen und Kaninchen – das heißt also bei Tieren, deren Knochenmark, wie das des Menschen, wenig lymphatische Zellen enthält – wurde dieses Syndrom kaum beobachtet. Außerdem scheint es nur dann zu entstehen, wenn Antikörper aus dem Implantat gegen die Antigene des Wirtes gebildet werden. Es ist also zu vermuten, daß das Syndrom ausbleibt, wenn einmal – wie im Falle der jugoslawischen Forscher – die Blutzellproduktion des Wirtes diejenige des Implantates abgelöst hat.

Wie weit lassen sich nun die experimentellen Erkenntnisse über die Behandlung von Strahlenschäden auch sonst noch in der Therapie des Menschen verwerten? Akute Strahlenunfälle sind doch bisher relativ selten und beschränken sich auf Laboratoriumsunfälle.

Es ist bereits daran gedacht worden, diffuse Neoplasien, wie zum Beispiel die Leukämie, durch intensive Bestrahlung zu behandeln und danach Knochenmark zu implantieren (FERREBEE 1958).

Es wurde auch schon versucht, bei schwerer Nephrosklerose die immunbiologische Abwehr durch eine Ganzbestrahlung auszuschalten und dann eine homologe Niere zu transplantieren. Solche Nieren könnte man ohne wesentliche technische Schwierigkeiten von einer Unfall-Leiche entnehmen. Organe, die eine bis zwei Stunden nach Eintritt des Todes gewonnen wurden, sind für die Transplantation noch geeignet.

Für die Überpflanzung hämatopoetischen Gewebes kommt nicht nur das Knochenmark adulter, blutgruppengleicher Spender in Betracht, sondern auch blutbildendes Gewebe von humanen Feten, die 16 bis 28 Wochen alt sind. FERREBEE hat Versuche damit gemacht und eine ausgezeichnete Verträglichkeit festgestellt. Wie bereits erläutert, ist bei Injektion von humanfetalem Gewebe die Gefahr einer unmittelbaren immunbiologischen Reaktion kaum gegeben. Auch FERREBEE konnte hierin die früheren Erfahrungen mit der NIEHANSschen Zellulartherapie bestätigen.

Die Möglichkeiten, humanfetales, hämatopoetisches Gewebe zu beziehen, sind gering. FERREBEE ist es in einer amerikanischen Großstadt im Durchschnitt nur einmal pro Woche möglich gewesen, einen geeigneten menschlichen Feten als Spender zu erhalten.

Aus den Knochen und der Leber eines menschlichen Feten kann man auch nur etwa 1 bis 2 Milliarden kernhaltiger, fetaler, hämatopoetischer Zellen gewinnen. Die optimale Zahl der zu implantierenden Zellen ist noch nicht genau bekannt. Die amerikanischen Forscher sind der Meinung, daß 25×10^9 Zellen übertragen werden müßten, um das durch Bestrahlung untergegangene Knochenmark beim Menschen zu regenerieren oder sogar zu ersetzen.

Die Therapie durch Implantation fetaler hämatopoetischer Zellen ist nicht auf Strahlenschäden beschränkt, sondern kann auch bei Schädigung des Knochenmarkes aus anderer Ursache mit Erfolg angewendet werden. NIEHANS hat etwa ab 1940 bei Störungen der Blutbildung fetale Leber- und Knochenmarkzellen injektionsimplantiert. Er hat darüber 1952 erstmalig publiziert. Seit 1953 liegen zahlreiche Mitteilungen vor über erfolgreiche Behandlung der gestörten Hämatopoese durch intramuskuläre Injektion von blutbildenden Zellen der fetalen Leber oder des Knochenmarks.

SCOTT, MATTHIAS und Mitarbeiter (1961) haben kürzlich diese Ergebnisse bestätigt. Sie berichteten über die Behandlung hypoplastischer Anämien durch intravenöse Injektion fetaler hämatopoetischer Zellen. Bei 14 Fällen von Anämie verschiedener Genese übertrugen sie fetale Leberzellen. Aus der Mitteilung geht indirekt hervor, daß es sich um Lebergewebe humanfetaler Provenienz handelte. Die intravenöse Injektion der Zellsuspensionen wurde jedesmal komplikationslos vertragen – auch bei Wiederholung. Das fetale Lebergewebe wurde «frisch» und unmittelbar übertragen, in einigen Fällen auch nach Konservierung. Von den 14 behandelten Patienten – unter denen sich Leukämiker im Endstadium befanden – gelang es in zwei Fällen von chronischer Pancytopenie, eine Dauerremission durch die Zellimplantation zu erreichen. Zwei weitere Patienten zeigten vorübergehende Besserung mit Normoblastämie.

THOMAS (1957), FERREBEE (1958), KURNICK (1958) und MATHÉ (1959) haben den neuen Weg der Kombination von Ganzbestrahlung mit Knochenmarkimplantation auch in der Behandlung der Leukämie versucht. Sie bestrahlten mit 200 bis 600 r und injizierten fetales oder adultes Knochenmark vom Menschen.

Im ganzen gesehen sind die klinischen Erfolge bei Leukämien bisher unbefriedigend. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß

die Patienten, an denen diese kühne Therapie erstmalig versucht wurde, hoffnungslose Fälle im Endstadium der Erkrankung waren. Möglicherweise genügte auch die verabreichte Röntgendosis nicht. Es fehlen noch die Röntgen-Apparate, mit denen man Patienten einer ausreichend intensiven Ganzbestrahlung aussetzen kann.

Daß wir hier aber vielleicht doch am Anfang eines neuen therapeutischen Weges stehen, geht aus den Mitteilungen von FERREBEE und MATHÉ hervor über eindrucksvolle Remissionen bei jungen Leukämikern, deren Erkrankung noch nicht so weit fortgeschritten war. Man wird abwarten müssen, wie sich diese Fälle weiter entwickeln. MATHÉ hat die besten Erfahrungen mit der Implantation von reifen, homologen Knochenmarkzellen gemacht. Er führt das darauf zurück, daß zum Bestrahlungseffekt eine Immunisierung der implantierten hämatopoetischen Zellen gegen die leukämischen Zellen hinzutritt. Der therapeutische Effekt war nämlich nur feststellbar, wenn der Überpflanzung eine Sekundär-Erkrankung folgte, als Auswirkung der immunbiologischen Reaktion zwischen den Zellen des Spenders und des Empfängers.

Inzwischen sind zahlreiche weitere Veröffentlichungen zur Implantations-Therapie der Leukämie und anderer Bluterkrankungen erschienen. Aus der großen Zahl der Publikationen seien hier nur einige charakteristische herausgegriffen:

KORINTH (1960) kombinierte bei Paramyeloblasten-Leukämie eine hochdosierte «Endoxan»-Behandlung mit einer nachfolgenden sternosternalen Übertragung gruppengleichen Knochenmarks und sah eindrucksvolle Remissionen.

WITTE (1961) behandelte akute Leukämien mit hohen Dosen von Cytostatica und beeinflußte die cytotoxische Knochenmarkschädigung durch nachfolgende Marktransfusionen. Von 18 behandelten Fällen erlebten 4 eine komplette Remission bis 21 Monate Dauer, 4 weitere eine partielle Remission von 5 bis 12 Wochen Dauer. Die hohe Dosis cytostatischer Medikamente wurde unter dem Schutz der Marktransfusion gut vertragen.

FLEISCHHACKER und STACHER (1960) behandelten ebenfalls die bei der cytostatischen Therapie der Leukosen auftretende Agranulocytose und Thrombocytopenie erfolgreich mit Übertragungen gruppengleichen Knochenmarks. Sie sahen wiederholt vollkommene Remissionen mit normalem Blutbild und Knochenmarkbefund, die monatelang anhielten.

Das Grundprinzip und die Anwendungstechnik dieser Übertragung von hämatopoetischen Zellen entsprechen der von NIEHANS

inaugurierten Methode der Injektionsimplantation von Zellsuspensionen. Die von diesen Autoren mitgeteilten Erfolge und Teilerfolge sind eine Bestätigung der NIEHANSschen Konzeption.

Es wurden auch Versuche gemacht, eine kombinierte Therapie von Bestrahlung und Implantation bei generalisierten *Neoplasmen* anzuwenden, wie zum Beispiel bei diffus metastasierenden Seminomen, Carcinomen oder Lymphomen (KURNICK 1958).

WITTE (1960) publizierte den Fall einer Patientin mit Mammacarcinom, bei der sich im Anschluß an eine hochdosierte lokale und allgemeine cytostatische Therapie eine schwere Knochenmarkschädigung mit dem klinischen Bild der Agranulocytose entwickelte. Im Knochenmarkpunktat fand sich eine Aplasie der Myelopoese mit pathologischen, jugendlichen Reticulumzellen. Nach Übertragung von gruppengleichem, frisch entnommenem Knochenmarkgewebe der Schwester der Patientin normalisierten sich innerhalb von einer Woche die Leukocytenzahlen, und die Agranulocytose wurde überwunden.

Da nunmehr die schädlichen Auswirkungen hochdosierter Bestrahlungen auf das hämatopoetische System durch eine Knochenmarkimplantation beeinflußt werden können, besteht die Möglichkeit, eine intensive Bestrahlung großer Körperbezirke bei diesen sonst in kurzer Zeit zum Tode führenden Erkrankungen einzusetzen. Wenn in solchen Fällen die carcinomatöse Aussaat noch nicht die Blutbildungsstätten befallen hat, kann man sogar autologes Knochenmark verwenden. Das Knochenmark wird dem Patienten vor der Bestrahlung entnommen, vital konserviert und nach der Bestrahlung re-implantiert.

Die Möglichkeit der vitalen Konservierung wird heute bereits benutzt, um von besonders gefährdeten Atomforschern Knochenmark zu entnehmen und es an geschützten Orten aufzubewahren, um es ihnen nach Strahlenunfällen re-implantieren zu können.

Faßt man die Entwicklung zusammen, wie sie sich in der Zellulartherapie von NIEHANS, der Injektionsimplantation hämatopoetischen Gewebes nach Strahlenschäden und Einwirkung von Cytostatica sowie in den Transplantationsversuchen ganzer Organe abzeichnet, so erkennt man, wie die verschiedensten Forschungsarbeiten unabhängig voneinander und von unterschiedlicher Problemstellung ausgehend, in eine gemeinsame Richtung münden. Man kann von einer *Renaissance* der bereits seit der Jahrhundertwende

bekannten Transplantations-Therapie sprechen. Amerikanische Wissenschaftler sprechen heute bereits von den «spare-parts», das heißt, dem Ersatzteillager menschlicher Organe. Wir sind von diesem therapeutischen Ziel nicht mehr so weit entfernt. Die technischen Voraussetzungen – die bei der Injektionsimplantation nie Schwierigkeiten bereitet haben – sind inzwischen auch bei Transplantationen ganzer Organe vorhanden. Als letztes Hindernis erweist sich nur noch die immunbiologische Barriere. Sie kann heute bereits durch Ausschaltung des gesamten immunbiologischen Abwehrapparates mittels Ganzbestrahlung überwunden werden. Es muß angestrebt werden, diese immunbiologische Barriere zu umgehen, indem Methoden entwickelt werden, eine spezifische Toleranz gegen einzelne Antigene – entweder die des Wirtes oder die des Spenders – auch bei adulten Individuen zu induzieren.



Anhang



Die Mitarbeiter

ANDRES, GERD, Dr. rer. nat., Privat-Dozent, Zoologisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Saarstraße 21

BERNHARD, PAUL, Prof. Dr. med., Facharzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, ehemaliger Chefarzt der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung am Evangelischen Krankenhaus (Ed.-Morian-Stiftung), Duisburg-Hamborn, Kaiser-Friedrich-Straße 47

DITTMAR, FRIEDRICH, Prof. Dr. med., Facharzt für innere Krankheiten, Chefarzt in der Weserberglandklinik, Höxter/Weser

DORNBUSCH, SIGRID, Dr. med., Fachärztin für innere Krankheiten, Rheumaklinik Kaiser-Friedrich-Bad, Wiesbaden

HOEPKE, HERMANN, Dr. med., Professor emer. Anatomie Heidelberg, Heidelberg, Werderplatz 8

KMENT, ALFRED, Prof. Dr., Vorstand der Lehrkanzel und des Instituts für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Wien, Wien III, Linke Bahngasse 11

KRAMPITZ, WALTER, Dr. med., Facharzt für Gynäkologie, Rheinhausen / Ndrh.

LANDSBERGER, ALBERT, Dr. med., Anatomisches Institut der Universität Heidelberg, Heidelberg, Brunnengasse 1

NEUMANN, KARLHEINZ, Dr. med., Privat-Dozent, Institut für Industrielle und Biologische Forschung, Köln a. Rh., Oberländer Ufer 118

RIETSCHEL, HANS-GEORG, Prof. Dr. med., Chefarzt der inneren Abteilung und leitender Arzt des Kreis- und Stadtkrankenhauses Herford, Herford i. Westf.

SCHMID, FRANZ, Prof. Dr. med., Kinderklinik der Universität Heidelberg, Heidelberg, Luisenstraße

SCHMIDT, HANS, Dr. med., Professor emer. Hygiene Marburg, Wabern-Bern, Selhofenstraße 23

STEIN, JOACHIM, Dr. med., Facharzt für innere Krankheiten, Heidelberg, Bergstraße 55

UHLENBRUCK, Prof. Dr. med., Chefarzt der inneren Abteilung des St. Vinzenz-Krankenhauses Köln, Köln-Hohenlind, Decksteiner Straße 17

VALLS CONFORTO, ANTONIO, Dr. med., Ex-profesor por oposicíon de la Facultad de Medicina, Jefe del Departamento de Bacteriología del Laboratorio Municipal, Barcelona, Paseo Bonanova, 19,6.°1.°



Literaturverzeichnis

AHMAD, N.D., und FRAZER: II. Int. Kongr. f. Bioch. Paris, S. 344 (1952).
AHRENS, E.H. und KUNKEL, H.G.: J. Exper. Med. *90*, 409 (1949).
ALGIRE, G. A.: La Biologie des Homogreffes. Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris (1957), S. 17.
ALLEGRETTI, N.: Naturwissenschaft 43, 525 (1956).
ALLEN, E. und DOISY, E.A.: J. Amer. Ass. 81, 819–821 (1923).
ALLEN, E. und DOISY, E.A.: Sex and internal secretions. Williams and Wilkins, Baltimore (1939).
ALLGOEWER, M.: Immunologie in Klinik und Forschung von P. Miescher und K.O. Vorlaender. Thieme Verlag Stuttgart (1957), S. 543.
ALTMANN, R.: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit & Co., Leipzig (1890).
ANDINA, F.: Erg. Chir. Bd. 38, 177 (1955).
ANDRES, G.: J. Exp. Zool., 122, 507–540 (1953), und 130, 221–249 (1955).
– Vorträge beim II. Intern. Kongreß für Zell- und Histotherapie, Wiesbaden (1959).
ANFINSEN, C. B., LOWRY, O. H. und HASTINGS, A. B.: J. Cell. Comp. Physiol. 20, 231–237 (1942).
ARGENTON, H., WAGNER, L. und FISCHER, H.: Zschr. exp. Med., *126*, 307 (1955).
ASBOE-HANSEN, G.: Int. Rev. Cytol., 3, 399–435 (1954).
ASBOE-HANSEN, G. und ZACHARIAE, L.: Acta path. microbiol. scand. 37, 145–149 (1955).
ASCHOFF, L.: Verh. Dtsch. Ges. inn. Med., *51*, 28 (1939).
ASCHOFF, L. und MEYER-LOHMANN, J.: Pflügers Archiv, *260*, 82 (1954/55).
ASHBY, W.: J. Exper. Med., 29, 267 (1919).
ATERMAN, K.: I. Amer. Med. Assoc. Arch. Path., *57*, 1 (1954).

BACQ, Z.M.: Experientia, *7*, 11–19 (1951).
BADER, H.: Z. Biol., *108*, 321 (1956).
BANGA, I. und BALO, J.: Biochimija, *22*, 60 (1957).
BARNES, D.W.H. und LOUTIT, J.F.: Proc. R. Soc. Med., *46*, 251 (1953).
– Nucleonics, *12*, 5, 68 (1954).
– J. Nat. Cancer. Inst., 15, 901–905 (1955).
– Butterworths Scient. Publ. London, 134–135 (1955).
BARROWS, C. H. jr., YIENGST, M. J. und SCHOCK, N. W.: J. Gerontol., *13*, 351 (1958).
BAUER, H.: Zschr. Zellforsch., 15, 225–247 (1932).
BAUER, K.F.: Methodik der Gewebezüchtung. Stuttgart, S. Hirzel (1954).
– Die Umschau, 54, 353–355 (1954).
– Dtsch. med. Wschr., 246 (1954), und 228 (1955).

– Monatskurse für ärztl. Fortbild., *5* (11), 468 (1956).
– Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung, Bd. 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1956).
Bauermeister, A.: Sonderdruck u. Dtsch. Ztschr. Chir. 292, 828 (1959).
– Aus: Gewebskonserven: Das Kieler Spanmaterial, Entwicklung, Eigenschaft, Klinische Erfahrungen. V. E. B. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1961), S. 161.
– Sonderdruck: Bruns Beitr. klin. Chir. *203*, 287 (1961).
Benacerraf, B. und Gell, P. G. H.: Studies on hypersensitivity. I. Immunology, *2*, 53 (1959), II. Immunology, *2*, 64 (1959), III. Immunology, *2*, 219 (1959).
Bennhold, H.: Dtsch. Med. Wschr., *79*, 17, 704–711 (1954).
Benoit, J., Leroy, P., Vendrely, C. und Vendrely, R.: Acad. Sci. (Paris), 250, 211–213 (1960).
Bensley, R. R. und Gersh, I.: Anatom. Record. *57*, 369–386 (1933).
Berenbom, M., Yokoyama, H. O. und Stowell, R. E.: Proc. Soc. Biol. Med., 81, 125–128 (1952).
Bergmann, J. und Schenker, E.: Schweiz. Arch. Tierheilkunde, 96, 127–143 (1954).
Bernhard, J.: Inaug. Diss. Tübingen (1958).
Bernhard, P.: Die Therapiewoche, *7*, 43-51 (1956/57).
– In: Zellulartherapie in Klinik und Praxis, 32–38, Hippokrates Verlag, Stuttgart (1956)
– Med. Mschr., Stuttgart, *10*, 6–10 (1956).
– 5. Tagg. Forschungsgemeinschaft Zellulartherapie 1./2. 3. 1958.
Bernhard, P. und Krampitz, W.: Zschr. Geburtsh., Stuttgart, *156*, 1 (1960).
Bernhard, W.: Klin. Wschr., *35*, 251 (1957).
Bernhard, W. und Granboulan, N.: Cellular Aspects of Immunity. A CIBA Foundation Symposium. I. A. Churchill Ltd., London (1960), 92.
Bersch, G.: Zschr. Krebsforschg., 59 (1953).
Bertalanffy, L. von: Theoretische Biologie. Bern (1951).
Bessis, M.: Die Zelle im Elektronenmikroskop. Sandoz-Monographie (1960).
Bethe, A.: Pflügers Archiv, *246*, 485 (1943).
Bierens De Haan und Bijlmer, L.: Ztschr. f. Tierpsychol., *3*, 30 (1939).
Billingham, R. E.: La biologie des homogreffes. Coll. Internat. C.R.N.S., Paris (1957).
– La biologie des homogreffes. Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris (1957), S. 183.
– Ann. New York Acad. Scienc. *73*, 782 (1958).
Billingham, R. E. und Medawar, P. B.: J. Exper. Biol., 29, 454–468 (1952).

Billingham, R. E., Brent, L. und Medawar, P. B.: Nature, *172*, 603–606 (1953), und *178*, 514–519 (1956).
– Proc.Roy.Soc.B, 143, 58–80 (1954).
– Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B, 239, 357–414 (1956).
Bing, R. J., Chiba, Ch., Chryschou, A., Wolf, P. L.: Circulation Baltimore, *25*, 273 (1962).
Bloch-Michel, H.: Ann. d. Endocrinol., *14*, 128 (1953).
Blomqvist, K.: Acta path. microbiol. scand. Suppl., 131 (1957).
Böhmig, R.: Virch.Arch.f.path.Anat., *311*, 25 (1943).
Brachet, J. und Mirsky, A. E : The Cell, Vol. I–V. Academic Press, New York und London (1961).
Brandner, R.: Fortschritte der Medizin, *76*, 453 (1958).
Brauch, F.: Dtsch.med.Wschr., *81*, 1086–1088 (1956).
Brecker, G. und Cronkite, E. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., *77*, 292–294 (1951).
Brent, L.: Tissue transplantation Immunity. Progr. Allergy, 5,271 (1958).
Brent, L., Brown, J. B. und Medawar, P. B.: Biological Problems of Grafting. Blackwell Oxford (1959), S. 64.
Bretschneider, L. H. und Elbers, P. F.: Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. (Amsterdam), Ser. C., 55, 675–688 (1952).
Briggs, F. N., Chemick, S. und Chaikoff, I. L.: J. Biol. Chem., *179*, 103 (1949).
Brown, R. B., Hufnagel, C. A., Pate, J. W. und Strong, W. R.: Surg. Gyn. Obstetr. 97, 657–664 (1953).
Brown, P.C. und Condsen, R.: Nature (London), *181*, 349 (1958).
Bruck, H.: II. Internat. Kongr. f. Zell- u. Histother., Wiesbaden (1959), S. 18.
Bueker, E.D.: Anat.Rec., 102, 369–390 (1948).
Bungenberg De Jong, H. G. und Bonner, J.: Protoplasma, 24, 198 (1935).
Bürger, M.: Altern und Krankheit als Problem der Biomorphose. Leipzig (1960).
Bürger, M. und Knobloch, H.: Ztschr. f. Altersforschg., *14*, 98 (1960).
Bürger, M. und Möbius, P. J.: Klin. Wschr. *II*, 1349 (1934).
Burnet, F. M. und Fenner, F.: The production of antibodies. Macmillan, Melbourne (1949).
Butler, L.O. und Bell, L.G.: Nature 171, 971–972 (1953).

Caffier, P.: Arch.exp.Zellforschg. IV/3, 419 (1927).
Callow, N.H.: Biochem.J. 33, 559 (1939).
Castens, C. E.: Hippokrates, Stuttgart, *48* (2), 40 (1957).
Catel, W., Pendl, J. und Schiff, O.: Dtsch. med. Wschr. 35, 1337–1340 (1953).
Chase, M. W.: Immunological reactions mediated through cells. In: The nature and significance of the antibody response, 156–169. A. M. Pappenheimer jr., Columbia Univ. Press, N.Y.

– Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. Med., *59*, 134 (1945).
Chieffi, M.: J. Gerontol., *5*, 17 (1950).
Christensen, B.G. und Jacobsen, E.: Acta med. scand. Suppl., 234, 103–108 (1950).
Chutná, J. und Haskova, V.: Folia biol. (Praha), 5, 85–88 (1959).
Chutná, J. und Pokorná, Z.: Folia biol. (Praha), 7, 32–45 (1961).
Clauberg, E.: Zbl. Gynäk., *55*, 459 (1931).
Cohen, S. und Levi-Montalcini, R.: Proc. Nat. Acad. Sci., 42, 571–574 (1956).
– 180. Cancer Res., 17, 15–20 (1957).
Cohen, S., Levi-Montalcini, R. und Hamburger, V.: 37. and 180. Proc. Nat. Acad. Sci., 40, 1014–1018 (1954).
Cohn, E.J.: Medicine, 24, 333–338 (1945).
Cole, L. J., Fishler, M. C. und Bond, V. P.: Proc. Nat. Acad. Sciences, *39*, 759–772 (1953).
Congdon, C.C.: Blood, *12*, 746 (1957).
– J. cell. comp. Physiol., *50*, Suppl. 1, 103–108 (1957).
Congdon, C. C. und Lorenz, E.: Am. J. Physiol., *176*, 297–300 (1954).
Congdon, C. C., Makinodan, T. und Gengozian, N.: J. nat. Cancer Inst., *18*, 603 (1957).
Congdon, C. C., Uphoff, D. und Lorenz, E.: J. Nat. Cancer Inst., *13*, 73–107 (1952).
Congdon, C.C. und Urso, I.: Radiation Res., *5*, 474 (1956).
– Am. J. Path., *33*, 749–767 (1957).
Converse, J. M., Ballantyne, O. L., Blair, Ph. O., Rogers, O. und Raisbeck, A. P.: La Biologie des Homogreffes. Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris (1957), S. 57.
Copeland, D.E : J. Nat. Canc. Inst. 12, 224–225 (1951).
Cosgrove, G. E., Schwartz, E. E., Upton, A. C. und Congdon, C. C.: Fed. Proc., *17*, 434 (1958).
Cramer, W. und Simpson, W. L.: Cancer Res., 4, 601–616 (1944).
Crawford, E. S., Creech, O. Jr., Cooly, D. A. und Bakey, M. E. de: Sth. Med. J. (Bgham, Ala) *49*, 665–667 (1956).
Creech, O. Jr., Bakey, M. E. de, Cooly, D. A. und Holt, B.: Surg. Gynec. Obstet. 103, 147–157 (1956).
Croiseille, Y.: Arch. Anat. micros., 47, 359–400 (1958).

Dahmen, H.: Dtsch. Schlacht- u. Viehhof-Ztg., Nr. 1 (1956).
Dammin, G. J.: Ann. Y. Acad. Sc., *64*, Art. 5, 967–976 (1957).
Danchakoff, V.: Am. J. Anat., 20, 255–327 (1916).
Dashiel, J. F.: Comp. Psychol. Monog., 7 (1930).
Dembowski, J.: Tierpsychologie. Akademie Verlag, Berlin (1955).
Dingemanse, E., Huis in't Veld, L. G. und de Laat, B. H.: J. Clin. Endocrinol., 6, 535 (1946).
Dinsmoor, J. A.: Zschr. f. Tierpsychol., *9*, 164 (1952).

DITTMAR, F., GROSS, A. und THOMAS, W.: Medizinische Welt, 1637 (1955).
DMOCHOWSKI, L. und MILLARD, A.: Brit. Med. J. *II*, 1136–1137 (1950).
DONNÉ: Referat 15. 5. 1962, Univ. Tübingen.
DOYLE, W. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 69, 43–44 (1948).
DOYLE, E. L. und LIEBELT, R.: J. Histoch. Cytochem., 3, 50–60 (1955).
DRESSLER, D. W. und MITCHISON, N. A.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA foundation symposium. I. A. Churchill, Ltd., London (1960), S. 227.
DuBOIS, A. M. und GONET, A.: Z. Zellforsch. 53, 481–491 (1961).
DUNSFORD, I., DOWLEY, C. C. und and.: Brit. Med. J., 81 (1953).

EBERIUS, E.: Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Lösung. Monographien zu «Angewandte Chemie» und Chemie-Ingenieur-Technik». Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1954).
EBERT, J. D.: Proc. Nat. Acad. Sci., 40, 337–347 (1954).
EHRICH, W. E., SEIFTER, J., ALBURN, H. E. und BEGANY, A. J.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 70, 183–184 (1949).
ENGSTRÖM, A.: Disc. Faraday Soc., 9, 427 (1950).
ERÄNKÖ, O.: Acta anat., 22, 331–336 (1954 a).

FARBWERKE HOECHST AG: Bericht d. Pharmakolog. Laborat. v. 1. VIII. 1958.
FECHT, K. E.: Medizinische Welt, *12*, 386 (1953).
FELIX, K.: Struktur und Funktion der Kerne tierischer Zellen. Verlag A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt (1961).
FELLINGER: Med. Klin., 46 (1951), 396.
FERREBEE, J. W., BILLEN, D., URSO, I. M., LU, W. C., THOMAS, E. D. und CONGDON, C. C.: Blood, *XII*, 1096–1100 (1957).
FERREBEE, J. W., LOCHTE, H. L., JARETZKI, A., SAHLER, O. D. und THOMAS, E. D.: Surgery, *43*, 516 (1958).
FERREBEE, J. W. und MERRILL, J. P.: Surgery, *41*, 503–507 (1957).
FERREBEE, J. W. und THOMAS, E. D.: Ann. Int. Med. C. Pincoffs, Editor, Paul W. Clough, Assistant Editor, *49*, July to December, 987–1003 (1958.)
– Am. J. Med. Sc., *235*, 369–386 (1958).
FISCHEL, W.: Methoden der tierpsychologischen Forschung. Bouvier & Co., Bonn (1953).
– Die höheren Leistungen der Wirbeltiergehirne. A. Barth Verlag, Leipzig (1956).
FISCHER, K.: Angew. Chemie, 48, 394–396 (1935).
FLEISCHHACKER, H. und STACHER, A.: Wien. Klin. Wschr., *72*, 38, 652–655 (1960).
FLOSDORF, E. W.: Freeze-drying. Reinhold, New York (1949).
FLOSDORF, E. W. und HYATT, G. W.: Surgery, 31, 716–719 (1952).
FLOSDORF, E. W. und KIMBALL, A. C.: I. J. Bact., 39, 255–261 (1940).
FLOSDORF, E. W. und MUDD, S.: J. Immunol., 29, 389–425 (1935).

– Blood substitutes and blood transfusion. C. C. Thomas, Publisher, S. 87 (1942).
FLOSDORF, E. W. und WEBSTER, G. W.: J. Biol. Chem., 121, 353 (1937).
FORD, C. E., HAMERTON, J. L., BARNES, D. W. H. und LOUTIT, J. F.: Nature, London, *177*, 452–454 (1956).
FORRESTER, J. S. und LANGNER, P. H. jr.: J. Immunol., 37, 141–148 (1939).
FRAUCHIGER, E.: Seelische Erkrankungen bei Mensch und Tier. Enke Verlag, Stuttgart (1944).
FREKSA, F. H. und ZAKI, F. G.: Ztschr. Naturforschg., *9b*, 394 (1954).
FREUND, J.: J. Exp. Med., 97, 711–726 (1953).
FRIBERG, U., GRAF, W. und ABERG, B.: Acta path. microbiol. scand., 29, 197–202 (1951).
FRY, R. M. und GREAVES, R. I.: J. Hyg. 49, 220–246 (1951).

GAILLARD, P. J.: Preservation and Transplantation of Normal Tissues. I. A. Churchill, Ltd., London (1954), S. 100.
– La Biologie des Homogreffes. Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris (1957), S. 157.
GELL, P. G. H.: Internat. Arch. Allergy, *13*, 112 (1958).
GERSH, I.: Harvey Lectures, Ser., 45, 211–241 (1950).
GERSH, I. und STIEGLITZ, E. J.: Anat. Rec., 58, 349–367 (1934 a).
GLINOS, A. D.: Science, 123, 673 (1956), zit. nach RIETSCHEL (1959).
GOETZ, A. und GOETZ, S. S.: Proc. Amer. Phil. Soc., 79, 361–388 (1938).
GOODWIN, T. W. und LINDBERG, O.: Biological Structure and Function, Vol. I. Academic Press, London-New York (1961).
GOOS: Ber. 2. Tagg. Forsch. Gem. Zellulartherapie 5./6. 3. 1955, S. 38.
GORDONOFF, T.: Med. Welt, 44, 2303–2307 (1960).
GRABAR, P.: Immunopathologie in Klinik und Forschung. Thieme Verlag, Stuttgart (1957), S. 1.
GRABAR, P. und CORVAZIER, P.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA foundation Symposium. I. A. Churchill, Ltd., London (1960), S. 198.
GREAVES, R. I.: Med. Res. Counc., Spec. Rep. Ser. Nr. 258, London, H. M. Stationary Office (1946).
GRIMMER, H.: Hautarzt, *8*, 388 (1955).
GRÜBER, H.: II. Tagung der Forschungsgem. f. Zelltherapie, Heidelberg (1955).
GRÜNEBERG, H.: The genetics of the mouse, 2nd ed. Nijhoff, The Hague (1952).
GUILLEMIN und ROSENBERG: Endocrinology, *57*, 599–607 (1956).
GURD, F. R., ONCLEY, J. L., EDSALL, J. T. und COHN, E. J.: Disc. Faraday Soc., 6, 70–74 (1949).
GUSTAVSON, K. H.: Acta chem. scand. (Kopenhag.), *8*, 1298 (1954).
GYE, W. E.: Brit. Med. J., I, 511–515 (1949).
HAAS, J.: Physiologie der Zelle. Verlag Gebr. Borntraeger, Berlin-Nikolassee (1955).

HADORN, E.: Roux' Arch., 125, 495–565 (1932), und 131, 238–284 (1934), und 136, 400–489 (1937).
– Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Thieme Verlag, Stuttgart (1955).
HALSTED, W. S.: J. Exp. Med., 11, 175–199 (1909).
HAMBURGER, V.: J. Comp. Neurol., 88, 221–284 (1948).
HAMBURGER, V. und LEVI-MONTALCINI, R.: J. Exp. Zool., 111, 457–502 (1949).
HAMBURGER, J., VAYSSE, J., CROSNIER, J., AUVERT, J., DORMONT, J.: Presse méd. Paris, *70*, 671 (1962).
HAMMER, B. W.: J. Med. Res., 24, 527–530 (1911).
HARBERS, E. und NEUMANN, K.: Klin. Wschr., 32, 337–342 (1954).
HARDEGG und MAASS: Bericht v. d. 5. Tagg. d. Forschungskreises f. Zellulartherapie 1./2. März 1958, Heidelberg.
HARDUNG, V.: Helvet. physiol. acta, *11*, 194 (1953).
HARRIS, D. L. und SHACKELL, L. F.: Amer. J. Publ. Health Assoc., 7, 52 (1910).
HARRIS, T. N. und HARRIS, S.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA foundation Symposium. I. A. Churchill, Ltd., London (1960), S. 172.
HASEK, M.: La Biologie des Homogreffes. Centre Nationale de la Recherche Scientifique Paris (1957), S. 215.
– Folia biol. (Praha), 6, 54–55 (1960).
HASEK, M., HRABA, T. und HORT, J.: Nature, 183, 1199–1200 (1959).
HASEK, M., LENGEROVA, A. und HRABA, T.: Adv. Immunol., *1*, 1 (1961).
HASKOVA, V.: Biological Problems of Grafting. Blackwell, Oxford (1959), S. 95.
HAUBOLD, H.: Med. Klinik, *49*, 1468 (1954).
HEINTZ, R.: Therapiewoche, *5*, 282, 11/12 (1954/55).
HEKTOEN, L.: J. Infect. Dis., *22*, 28–33 (1918).
HENAFF, F.: Parkes and Smith, Blackwell scientific Pub., Oxford (1960).
HERDER, GROSSE: Verlag Herder, Freiburg (1956).
HERINGA, G. C. und WEIDINGER, A.: Ref. Zbl. Path., *77*, 388 (1941).
HESS, G. und HESS, M.: Arch. Gynäk., *181*, 700 (1952).
HEVELKE, G.: Habilit. Schr. Leipzig (1956); Zschr. f. Altersforschg., *14*, 185 (1960).
HILDEMANN, W. H.: Transpl. Bull., 3, 144–145 (1956).
– Ann. N.Y. Acad. Sci., 64, 775–790 (1957).
– Immunology, 1, 46–53 (1958).
HILDEMANN, W. H. und HAAS, R.: J. Immunol., 83, 478–485 (1959).
– Evolution, 15, 267–271 (1961).
HILDEMANN, W. H. und OWEN, R. D.: Transpl. Bull., 4, 132–134 (1956).
HILL, J. M. und MUIRHEAD, E. E.: J. Laborat. Clin. Med., 27, 812–819 (1942).
HINSBERG, K.: Bericht vom 23. 4. 1958.

HIRSCHBERG, E. und RUSCH, H. P.: Cancer Res., *10*, 335–338 (1950).
HOEPKE, H.: Zschr. Krebsforschg., 58 (1952).
– Verh. dtsch. Anat. Ges. (1953).
– Verh. Dtsch. Ges. Path. (1953).
– Medizinische, Stuttgart (1954).
– Mikroskopie, Wien, 10 (1955).
– Mediz. Welt, 35 (1960).
– Histo- und Zellulartherapie (1959).
– Dtsch. med. J., Jg. *3* (1952), Jg. *6* (1955), Jg. *13* (1962).
HOEPKE, H. und FLUHR, R.: Therap. Woche, Karlsruhe, 15/16 (1955/1956).
HOEPKE, H. und SCHEPELMANN: Dtsch. med. J., Jg. 11 (1960).
HOERR, N. L.: Anat. Rec., 65, 293–313 (1936 a).
HOFF, F.: Medizinische, 17, 587–596 (1957).
HÖFS, W.: Zschr. inn. Med., *1*, 2 (1954); *5*, 217 (1954).
HOFSTÄTTER, P.: Psychologie. Fischer Bücherei (1957).
HOLMGREN, H. J.: Z. mikr.-anat. Forsch., 47, 489–521 (1940).
HOLMGREN, H. J. und WILANDER, O.: Z. mikr.-anat. Forsch., 42, 242–278 (1937).
HOLTFRETER, J.: Arch. Exper. Zellforsch., 23, 169–209 (1939).
HÖRSTADIUS, S.: The neural crest. London, Oxford Univ. Press (1950).
HORSTMANN, E. und KNOPP, A.: Z. Zellforschg., *46*, 100 (1957).
HOSEMANN, H.: Die Grundlagen der statistischen Methoden für Mediziner und Biologen. Verlag Thieme, Stuttgart (1949).
HUFNAGEL, C. A.: Preserved homologous arterial transplants. Clin. Congr. Amer. Coll. Surg. New York. Ref. in: Bull. Amer. Coll. Surgeons, 32, 231 (1947).
– Experimental and clinical observations on the transplantation of blood vessels. In: The preservation of normal tissues for transplantation. CIBA foundation symposium (1954).
HUFNAGEL, C. A. und EASTCOTT, H. H. G.: Lancet, I, 531–537 (1952).
HULL, C. L.: Psych. Rev. Comp., 49 (1932).
HUMPHREYS, T.: Transpl. Bull., 26, 118/120 (1960).
HUSSLEIN, H.: Prakt. Arzt, 307 (1953).
HUSTEN, K.: Schriftl. Mitt. 10. 8. 1956, und 13. 9. 1957.
– Mündl. Mitt. 20. 1. 1958.
HYATT, G. W.: Parkes and Smith, Blackwell scientific publications, Oxford, 251–280 (1960).
HYATT, G. W., Turner, T. C. und BASSETT, C. A. L.: Nav. M. News Letter, 18, Nr. 10 (1950).

JACOB, M., MANDEL, L. und MANDEL, P.: Experentia, *10*, 218 (1954).
JACOBSON, L. O.: Cancer Res., *12*, 315–325 (1952).
– Amer. J. Roentgenol., 72, 543 (1954).
JACOBSON, L. O. und and.: J. Lab. Clin. Med., *34*, 740 (1949).

JACOBSON, L. O., MARKS, E. K. und GASTON, E. O.: Radiobiology Symposium Liège 1954. Butterworth, London, 122–133 (1955).
JACOBSON, L. O., MARKS, E. K., GASTON, E. O., ROBSON, M. J. und ZIRKLE, R. E.: J. Lab. Clin. Med., *34*, 1538–1543 (1949).
– Proc. Soc. Expt. Biol. Med., *70*, 740 (1949).
JACOBSON, L. O., MARKS, E. K. und LORENZ, E.: Radiology, *52*, 371–395 (1949).
JACOBSON, L. O., ROBSON, M. J. und MARKS, E. K.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., *75*, 145 (1950).
JACOBSON, L. O., SIMMONS, E. L., MARKS, E. K. und ELDREDGE, J. H.: Science, 113, 510 (1951).
JACOBSON, L. O., SIMMONS, E. L., MARKS, E. K., GASTON, E. O., ROBSON, M. J. und ELDREDGE, J. H.: J. Lab. Clin. Med., 37, 683–697 (1951).
JACOBSON, L. O., SIMMONS, E. L., MARKS, E. K., ROBSON, M. J., BETHARD, W. F. und GASTON, E. O.: J. Lab. Clin. Med., *35*, 746 (1950).
JAMMET, H., MATHÉ, G., PENDIC, B., DUPLAN, J.-F., MAUPIN, B., LATARJET, R., KALIC, D., SCHWARZENBERG, L., DJUKIC, Z. und VIGNE, J.: Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., IV, 210–225 (1959).
JELLINGER, K. und SEITELBERGER, F.: Klin. Wschr., *36*, 437–441 (1958).
JONES, P. F.: I. A. Churchill Ltd., London (1954), S. 110.
JONGH, D. K. DE: Ned. tschr. geneesk., *104*, 1332–1346 (1960).
JORES, A.: Klinische Endokrinologie. Springer Verlag (1949).
JORPES, E., HOLMGREN, H. J. und WILANDER, O.: Z. mikr.-anat. Forsch., 42, 279–301 (1937).
JULÉN, C., SNELLMAN, O. und SYLVÉN, B.: Acta Physiol. Scand., 19, 289–305 (1950).
JUNG, F.: Naturwiss., *43*, 73 (1956).
MCJUNKIN, F. A. und BREUHAUS, H. C.: Arch. Path., 12, 900–908 (1931).
MCJUNKIN, F. A. und MATSUI, T.: Arch. Path., 12, 794 (1931).

KALB, H. W.: Diss. München (1959).
KALK: Diskussionsbemerkung. 2. Tagung d. Forsch.-Gem. f. Zellulartherapie, Heidelberg (1955).
KALLISS, N.: Cancer Res., 18, 992–1003 (1958).
KARNBAUM, S.: Z. Ges. Exper. Med., *128*, 510 (1957).
KATSCH, S.: N. Y. Acad. Sc., *73*, 698, (1958).
KEIL, E.: Strahlentherapie, 83, 223–235 (1954).
KELLY, L. S. und JONES, H. B.: Amer. J. Physiol., 172, 575–578 (1953).
KIDD und TOOLAN: Americ. J. Path., 26 (1950).
KIRK, E. und KVORNING, S. A.: J. Gerontol., *4*, 273 (1949).
KLEIN, E.: Z. Altersforschg., *5*, 184 (1951).
KLEIN, P.: Endokrinologie, *34*, 348 (1957).
KLEINMAIER, H.: Zschr. Immunit. Forsch., Jena, *112*, 382 (1955).
KLEINSORGE, H.: Ber. 3. Tagg. d. Forsch. Gem. Zellularther. 15–19 (1956).

KLEINSORGE und MAY: Schriftl. Mitteilg.
KLUDAS, M.: Therap. Woche, 19/20, 491 (1954).
KLUG, H.: Bau und Funktion tierischer Zellen. Verlag A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt (1961).
KMENT, A.: Deutsche Therapiewoche 1956, Karlsruhe.
– Forschungsgem. Zellulartherap. 16./17. 3. 1957.
– 5. Tagg. Forsch. Gem. Zellulartherapie 1./2. 3. 1958, S. 33.
– Med. Klin., *53*, 15, 645–647 (1958).
– II. Int. Kongreß f. Zell- und Histotherapie, Wiesbaden (1959).
– 8. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Zellulartherapie, Bad Homburg (1960).
– III. Int. Kongreß f. Zellulartherapie, Paris (1961).
– Deutsche Therapiewoche 1961, Karlsruhe.
– Symposion über Zellulartherapie, Kairo, 1960.
KMENT, A., LEIBETSEDER, J. und STEININGER, K.: Therapiewoche, *11*, 9, 489 (1961).
KMENT, A., LEIBETSEDER, J. und SUMMER, E.: Therapiewoche, *12*, 11, 419–425 (1962).
KNAKE, E.: Virchows Arch. path. Anat., *319*, 321 (1950); *321*, 508 (1951); *324*, 1 (1953); *325*, 580 (1954); *327*, 533 (1955).
– Blackwell scientific Publications Oxford, 34, I (1959), S. 341.
KNAKE, E. und ENGELBART: Virchows Arch. path. Anat., 329, 373 (1956/1957).
KNÜCHEL, F.: Vortrag 60. Kongr. dtsch. Ges. inn. Med., 273 (1954).
– Forschungsgemeinsch. Zellularth. Ber. v. 5./6. 3. 1955. und 3./4. 3. 1956.
KNÜCHEL, F. und KUHN, W.: Vortrag Therapie-Kongreß (1954).
– Medizinische, 16, 587–593 (1955).
KOCH, G.: Dissert. a. d. med. Fakultät d. Univ. Göttingen. Z. f. Zellforschung (1956).
KÖHLER, U.: Naturw. Rdsch., *14*, 384 (1961).
KÖNIG, W.: Zschr. exper. Med., 126 (1955).
KOPPEN, A.: Arch. Gynec., 183, 301 (1953).
KORINTH, E.: Münch. Med. Wschr., *102*, 53, 2622–2624 (1960).
KREUZ, F. P., HYATT, G. W., TURNER, T. C.: J. Bone Surg., 33 A, 863–872 (1951).
– Arch. Surg., 64, 148 (1952).
KROHN, P. L.: Biological Problems of Grafting. Blackwell Oxford (1959), S. 146.
KÜHN, A.: Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955).
– Grundriß der Vererbungslehre. Verlag Quelle und Meyer, Heidelberg (1961).
KUHN, H.: Advanced Enzymol., *20*, 1 (1958).
KUHN, W.: Zellulartherapie in Klinik und Praxis. Hippokrates Verlag, Stuttgart (1956).

KUHN, W. und FUCHS: Die Zellulartherapie von Paul Niehans. Urban & Schwarzenberg (1954), S. 419.
KUHN, W. und KNÜCHEL, F.: Med. Klin., *35*, 1363 (1954).
– Zschr. exper. Med., *123*, 351 (1954).
– Vortrag Therapiekongreß (1954).
– Med. Klinik, *35*, 1363 (1954).
– P. Niehans «Die Zellulartherapie». Verlag Urban & Schwarzenberg, München (1954), S. 415.
KUHNKE, E. und SCHÖNFELDER, M.: Pflügers Archiv, *263*, 511 (1956).
KURNICK, N. B., MONTANO, A., GERDES, J. C. und FEDER, B. H.: Preliminary Observations on the Treatment of Postirradiation Hematopoietic Depression in Man by the Infusion of Stored Autogenous Bone Marrow. Ann. Intern. Med., *49*, 973–986 (1958).
KURTZAHN, H. und HÜBENER, H.: Zbl. Chir., 27, 1666–1669 (1927).
KÜTTNER: Zbl. Chir., 12, 39, 390–397 (1912).
– Bruns Beitr. Klin. Chir., 145, 721–723 (1929).

LAHIRI, D. C.: Indian J. Med. Res., *35*, 7–13 (1947).
LANDSBERGER, A.: Therapiewoche, *12*, 11, 436–443 (1962).
– Klin. Wschr., 10 (1962).
– Klin. Wschr., *40* (1962).
– Dtsch. med. Wschr. (1962).
LANDSTEINER, K. und CHASE, M. W.: J. Exper. Med., *66*, 337 (1937); *71*, 237 (1940).
LANG: In THIEL, A.: Mitochondrien. Dtsch. Med. Wschr., *84*, 2038 (1959).
LANG, K. und SIEBERT, G.: Die chemischen Leistungen der morphologischen Zellelemente. In: FLASCHENTRÄGER, B. und LENARTZ, E.: Physiologische Chemie, 2. Bd., 1. Teil, 1064, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1954).
LANGENDORFF und andere: Atomkernenergie, 4, 267, 70 (1951).
LANGENDORFF, H., KOCH, R. und SAUER, H.: Strahlentherapie, *93*, 273–280 (1954).
LANGER, P. H. und FORRESTER, J. S.: The disintegration of bacteria by mechanical means, I, *II*. J. Immunol., 37, 133 (1939).
LANGLEY, L.: Cell Function. Reinhold Publishing Corporation, New York (1961).
LAUDAHN, G.: Morphologie, Biologie und Pathophysiologie des Menschen. Editio Cantor, Aulendorf i. W. (1959).
– Ärztl. Forschg., 10, I/513 (1956).
LAWRENCE, H. S.: Physiol. Rev. (Wash.), 39, 811–859 (1959).
LAWRENCE, H. und SHERWOOD: J. Immunol., Baltimore, *68*, 159 (1952).
– Sympos. N. Y. Acad. of Medicine (1959).
LAZOVSKAYA, L. N.: Biochimia, *8*, 171 (1943).
LEIBETSEDER, J. und STEININGER, K.: Preisschrift TIHO, Wien (1960).

LENNERT, K.: Hdb. d. spez. pathol. Anat. u. Histol. I/3, A (1961).
LENNERT, K. und SCHUBERT, J. C. F.: Z. Path., 69, 579–590 (1959).
LERCHE: Therapiewoche, VI. Jg., 5/6 (1955/1956).
LERMA, B. DE: Die Anwendung von Fluoreszenzlicht in der Histochemie. In: GRAUMANN und NEUMANN: Handbuch der Histochemie, Bd. I/1, 78–159 (1958).
LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie. Verlag Georg Thieme, Stuttgart (1959).
LETTRÉ, H.: Arzneimittelforschg., *4*, 8, 484–485 (1954).
– Naturw. Rdsch., 12, 495–498 (1954).
– Die Therapiewoche, 5, 152 (1955).
– Antibiotica und Chemotherapie, Vol. 8 (1960).
LETTRÉ, H., HEMPRICH, F. K. und SPIRIG, B.: Z. Krebsforschg., *59*, 64 (1953).
LEUCHTER: Landarzt, *32*, 23 (1956).
LEUTERT, G.: Zschr. f. Altersforschg., *14*, 188 (1960).
LEUTHARD, F. und MÜLLER, A. F.: Experientia, *4*, 478 (1948).
LEVANDER, G.: Klin. Wschr., *40* (1941).
– Arch. klin. Chirg., Berlin, *202*, 497 (1941).
– Presse méd., *59*, 295 (1951).
– Langenbecks Arch. klin. Chir., *274*, 255 (1953).
– Forschungsgem. Zellulartherapie, 16./17. 3. 1957.
LEVER, J. D.: Anat. Rec., *128*, 361 (1957); In: Elektron Microscopy, Proc. of the Stockholm Conf. Sept. 1956, Stockholm (1957).
LEVI-MONTALCINI, R.: Ann. New York Acad. Sci., 55, 330–343 (1952).
– La biologie des homogreffes. Coll. Int. C.R.N.S. Paris (1957).
LEVI-MONTALCINI, R. und HAMBURGER, V.: J. Exp. Zool., 116, 321–362 (1951).
– J. Exp. Zool., 123, 233–288 (1953).
LEVI-MONTALCINI, R., MEYER, H. und HAMBURGER, V.: Cancer Res., 14, 49–57 (1954).
LEWALD, H.: Inaugur. Diss., Heidelberg (1961).
LEWIS, L. A. und REIN, CH. R.: J. Amer. Geriatr. Soc., *4*, 920 (1956).
LINDSLEY, D. L., ODELL, T. T. jr. und TAUSCHE, F. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *90*, 512–515 (1955).
LINDVALL, S. und CARSJÖ, A.: Arkiv. Kemi, 2, 293–295 (1950).
LJUNGDAHL, M.: Untersuchungen über die Arteriosklerose des kleinen Kreislaufes. J. F. Bergmann-Verlag, Wiesbaden (1915).
LOCKER, A. und MOSER, K.: Zschr. exper. Med., 127, 558 (1956).
LOESER, A. A.: Ärztl. Praxis, *52*, 3 (1950).
LONGMIRE, W., CANNON, I. A. und WEBER, R. A.: Preservation and Transplantation of Normal Tissues. I. A. Churchill Ltd., London (1954), S. 23.
LORENZ, E. und CONGDON, C. C.: J. of the Nat. Cancer Inst., *14*, 955–961 (1954).

LORENZ, E., CONGDON, C. C. und UPHOFF, D.: Radiology, *58*, 863–877 (1952).
LORENZ, E., UPHOFF, D., REID, T. R. und SHELTON, E.: J. Nat. Cancer Inst., *12*, 197–201 (1951).
LOVELOCK, J. E.: Proc. Roy. Soc. Med., *47*, 60–61 (1954).
LOW, F. N.: J. biophys. biochem. Cytol., 2, 337 (1956).
LOWTON, R. W.: Circulation Res., *3*, 403 (1955).
LUND, H. A., VATTER, A. E., HANSON, J. B.: J. biophys. biochem. Cytol., *4*, 87 (1958).
LUYET, B. J.: Freezing and drying, report of a symposium. The Inst. of Biol. London W. C., I. 77–98 (1951).
LUYET, B. J. und GOMEZ, A.: Biodynamica, 6, 151 (1947).

MA, C. K. und COWDRY, E. V.: J. Geront., *5*, 203 (1950).
MACPHERSON, C. F. C. und HEIDELBERGER, M.: J. Amer. Chem. Soc., *67*, 585 (1945).
MAISCHEIN: Ber. 2. Tagg. Forsch. Gem. f. Zellularth., 5./6. 3. 1955, S. 46.
MAKINODAN, T. und andere: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., *92*, 174–179, (1956).
MAKINODAN, T., GENGOZIAN, N. und CONGDON, C. C.: J. Immunol., *77*, 250–256 (1956).
MALMGREN und BENNISON: J. Nat. Cancer Inst., *11*, 301 (1950).
MARSHAK, D. und WALKER, A. C.: Science, *94*, 101 (1945).
– Amer. J. Physiol., 143, 226–234 (1945).
MARQUARDT, P. und FRANZ, G.: Arzneim. Forschg., Aulendorf, *11*, 544f. (1961).
MARYMAN, H. T.: Diskussionsbemerkung in: Freezing and drying, report of a symposium, S. 200 (1951).
MASUCCI, P.: J. Lab. Clin. Med., 31, 340–345 (1949).
MATHÉ, G. und BERNHARD, I.: Extrait du Sang, XXX, *789* (1959).
MATHÉ, G., BERNARD, J., SCHWARZENBERG, L., LARRIEU, M.-J., LALANNE, CL. M., DUTREIX, A., DENOIX, P.-F., SURMONT, J., SCHWARZMANN, V. und CÉOARA, B.: Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., *IV*, 675–704 (1959).
MATHÉ, G., JAMMET, H., PENDIC, B., SCHWARZENBERG, L., DUPLAN, J.-F., MAUPIN, B., LATARJET, R., LARRIEU, M.-J., KALIC, D. und DJUKIC, Z.: Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol., *IV*, 226–238 (1959).
MAXIMOW, A.: Arch. exp. Zellforschg., V/3, 169 (1928).
MAYER, W. W.: Klin. Wschr., *36*, 424 (1950).
– Virch. Arch. f. path. Anat., *320*, 67 (1951).
– Zellforschung, *43*, 383 (1955).
– Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforschg., *23*, 346 (1957); *24*, 15 (1958).
MAYERSBACH, H.: Acta Anat., *30*, 487–507 (1957).
MEDAWAR, P. B.: Ann. N. Y. Acad. Sc., *73*, 539 (1958).

– Biological Problems of Grafting (Symposium). Blackwell, Oxford (1959), S. 6.
– A CIBA foundation Symposion. I. A. Churchill, Ltd. (1960), S. 134.
– Selecta, *IV.*, 19, 14–15 (1962).
– I. A. Churchill Ltd., London (1954), S. 1.
– La Biologie des Homogreffes. Centre Nationale de la Rech. Scientifique, Paris (1957), S. 273.
– The uniqueness of the individual. Methuen & Co., London (1957).
– Proc. Roy. Soc. (London) B, 149, 145–160 (1958).

Merrill, I. O.: Physiol. Rev. Baltimore, *39*, 860 (1959).

Meryman, H. T.: Instit. of. Biol., London, S. 200 (1951).

Metschnikoff, E.: Phagocyten und ihre experimentelle Grundlage. Hb. pathog. Mikroorgan. Fischer-Verlag, Jena, *4*, 332 (1904).

Meves: In: Thiel, A.: Mitochondrien. Dtsch. Med. Wschr., *84*, 2038 (1959).

Millahn, H. P. und Jaster, D.: Biol. 111, 351 (1960).

Mirsky, A. E.: Science, *84*, 333–334 (1936).

Moench, A.: Ber. 2. Tagg. Forschg. Gem. Zellulartherapie, März 1955, S. 49.

Mohr, H. J. und Möllhoff, H.: Zschr. exper. Med., *120*, 455 (1953).

Möllendorf, v.: Die Zelle und ihre Umwelt. Handb. d. Biochem., 2. Aufl. II, 276 (1925).

Monroy, A.: Exp. Cell. Res., 1, 92 (1950).

Moscona, A. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 92, 410–416 (1956).
– Proc. Nat. Acad. Sci., 43, 184–194 (1957).
– 18th Growth Symposium Ronald Press Co. (1960).

Möse, J. K., Wennig, F. und Stein, O.: Zschr. Alternsforschg., Bd. *X*, 4 (1957).
– Medizinische, 31/32, 1200–1202 (1958).

Müller, H. G.: Dtsch. med. Wschr., *77*, 909 (1952).

Müntzing, A.: Vererbungslehre. Verlag G. Fischer, Stuttgart (1958).

Muralt, A. v.: Die Signalübertragung im Nerven. Basel (1946).

Murphy, J. B.: J. Exper. Med., 24, 1–6 (1916).

Napolitano, L. und Fawzett, D.: J. biophys. biochem. Cytol., *4*, 685 (1958).

Naylor, H. B. und Smith, P. A.: J. Bact., 52, 565–573 (1946).

Neidel, R.: Fortschr. d. Med., *73*, 415 (1955).

Netter, H.: Theoretische Biochemie. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1959).

Neumann, K.: Forsch. Berichte Wirtsch. und Verkehrsministerium Nordrhein-Westf., Ausg. 1954, S. 35–39.
– Vortr. Tagg. d. Ausschusses Vakuumtechnik VDI. Bad Homburg 3. 11. 1954.
– Verh. Anat. Ges., 52, Vers. 101, 169–180 (1954).

– Grundriß der Gefriertrocknung. Musterschmidt, wissenschaftlicher Verlag, Göttingen, 2. Aufl. (1955).
– Vakuum-Techn. 3, 24–30 (1955).
– Ber. v. d. 5. Tagg. d. Forschungskreises f. Zellulartherapie, Heidelberg (1958).
– 1. Bericht v. 1. 10. 1958.
– 2. Bericht v. 1. 10. 1958.
– Anwendung der Gefriertrocknung für histochemische Untersuchungen.
– Handbuch der Histochemie, Band 1, 1–77 (1958).
– II. Int. Kongr. f. Zell- und Histotherapie, Wiesbaden (1959, Oktober).
– Gewebekonserven-Herstellung und Anwendung. Berlin (1961), S. 5–24.
NEUMANN, K. und HARBERS, E.: Forschungsgem. Zellulartherapie, 6. 3. 1954.
NIEHANS, P.: Die endokrinen Drüsen und die Methoden der Verjüngung. Vortrag am XV. Schweiz. Chirurgen-Kongreß. Verlag Benno Schwabe, Basel (1928).
– Les glandes endocrines et les méthodes de rajeunissement. Verlag Benno Schwabe, Basel (1930).
– Krebs und endokrine Drüsen. Verlag Benno Schwabe, Basel (1933).
– Cancer et glandes endocrines. Verlag Benno Schwabe, Basel (1933).
– Das Alter, seine Beschwerden und die Verjüngung. Verlag Hans Huber, Bern (1936).
– Prostata-Hypertrophie. Verlag Hans Huber, Bern (1936).
– Hypertrophie de la prostate. Presse méd., Paris, Masson Cie (1936).
– Modern views on Hypertrophy of the prostate. Lancet, London (1936).
– La sénescence et le rajeunissement. Verlag Vigot frères, Paris (1937).
– 10 Jahre hormonale Behandlung der Prostata-Hypertrophie. Verlag Hans Huber, Bern (1937).
– 10 Years hormon treatment of hypertrophy of the prostate. Adlard, London (1938).
– Die endokrinen Drüsen des Gehirns (Lehrbuch). Verlag Hans Huber, Bern (1938).
– Der Mensch, seine hormonalen Störungen und ihre Behandlung. Verlag Hans Huber, Bern (1938).
– L'homme et ses insuffisances hormonales. Verlag Klausfelder, Vevey (1938).
– Prostata-Krebs wie Paraprostata-Hypertrophie sind Folgen hormonaler Störungen. Verlag Hans Huber, Bern (1940).
– Les cancer de la prostate et l'hypertrophie des glandes paraprostatiques. Schweiz. Zeitschrift für Biochemie (1941).
– Krebs-Krankheit. Verlag Hans Huber, Bern (1945).
– Le cancer. Verlag Klausfelder, Vevey (1945).
– El cáncer. Verlag Revue Argentine, Genève (1947).
– Alters-Hypertrophie paraprostatischer Drüsen und Prostata-Krebs. Verlag Hans Huber, Bern (1948).

– Hypertrophie des glandes paraprostatiques et cancer de la prostate. Verlag Hans Huber, Bern (1948).
– 20 Jahre Überpflanzung innersekretorischer Drüsen. Verlag Hans Huber, Bern (1948).
– 20 ans de transplantation de glandes endocrines. Verlag Hans Huber, Bern (1948).
– Biologische Behandlung kranker Organe bei Menschen und Tieren. Verlag Hans Huber, Bern (1948).
– Traitement biologique des maladies organiques chez l'homme et chez l'animal. Verlag Hans Huber, Bern (1948).
– Trattamento biologico di organi ammalati di uomini e di animali. Verlag Hans Huber, Bern (1948).
– Biological treatment of diseased organs in human beings and animals. Verlag O. Schläfli, Interlaken (1948).
– Biologische Behandlung kranker Organe durch Einspritzen lebender Zellen. Verlag A. Schmid & Co., Bern (1949).
– Traitement biologique des maladies organiques par injection de cellules vivantes. Verlag A. Schmid & Co., Bern (1949).
– Trattamento biologico di organi ammalati mediante iniezioni di cellule fresche. Verlag A. Schmid & Co., Bern (1949).
– Tratamiento biològico de las enfermedades orgànicas por inyección de células vivas. Verlag A. Schmid & Co., Bern (1949).
– Traitement des néoplasmes prostatiques. Vie méd., Paris (1949).
– Zur Behandlung der Xanthomatose. Heilkunst (1951).
– 20 Jahre Zellular-Therapie. Med. Klin., *47/15* (1952).
– Insel-Zellen zur Bekämpfung des Pancreas-Diabetes mellitus (Nr. 1). Med. Klin., *48*, 1936 (1953).
– Organ-Zellen im Kampfe gegen den Krebs. Med. Klin., *49*, 1289f. (1954).
– Die Zellular-Therapie (Lehrbuch). Verlag Urban & Schwarzenberg, München (1954).
– Terapéutica celular (Lehrbuch). Labor S. A., Barcelona (1955).
– Zellular-Therapie. Vortrag vor der Naturforschenden Gesellschaft in Solothurn am 31. 1. 1955. Verlag Hans Huber, Bern (1955).
– Thérapie cellulaire. Exposé à la Société d'Histoire naturelle de Soleure, 31 janvier 1955. Verlag Klausfelder, Vevey (1955).
– Terapéutica celular. Conferencia dada ante la Sociédad de Investigadores de la Naturaleza en Solothurn (Suiza) el 31 de Enero de 1955. Verlag Hans Huber, Bern (1955).
– Cellular Therapy. Conference given for the Society of Natural History at Solothurn, January 1955. Verlag Hans Huber, Bern (1955).
– Die Zellular-Therapie. Therapiekongreß, 1–5 (1954. Therap. Woche, Karlsruhe, *V*, 156–159 (1954/55).
– Die Zellular-Therapie. Zellular-Therapie in Klinik und Praxis, Kuhn, W., Hippokrates-Verlag, Stuttgart, 9–15 (1956).

– Einführung in die Zellular-Therapie. Verlag Hans Huber, Bern (1957).
– B-Inselzellen zur Heilung des Pankreas-Diabetes mellitus (Nr. 2). Verlag Hans Huber, Bern (1958). Referatenblatt Die Zellular-Therapie, 22 (1958).
– Cellules B des îlots de Langerhans et guérison du diabète sucré pancréatique (No 2). Librairie Payot, Lausanne (1958).
– B-cells from the islets of Langerhans, for the cure of pancreatic diabetes mellitus (No. 2). Librairie Payot, Lausanne (1958).
– Cellule insulari B. per la guarigione del diabete melito pancreatica (No 2). Verlag Treveri, Roma (1958).
– La Thérapeutique cellulaire. Payot frères, Lausanne (1958).
– Introduction to Cellular Therapy. Coopers' Square Publishers, 59 Fourth Ave., New York 3 (1960).
– La terapia cellulare. Verlag Treveri, Roma (1960).
– B-Zellen der Inseln des Pankreas im Kampfe gegen Diabetes mellitus pancreaticus (Nr. 3). Referatenblatt Die Zellular-Therapie, Sondernummer (1960).
– Les cellules B. des îlots de Langerhans dans la lutte contre le diabète sucré pancreatique (No 3). Verlag Hans Huber, Bern (1960).
– B-cells from the islets of Langerhans, for the cure of pancreatic diabetes mellitus (No. 3). Verlag Hans Huber, Bern (1960).
– Dell'utilità delle cellule B dell'insula pancreatica nelle cura del diabete mellito pancreatico (No. 3). Verlag Treveri, Roma (1960).
Nowell, P. C., Cole, L. J., Roan, P. L. und Habermeyer, J. G.: Cancer Res., *16*, 258–261 (1956).

Oetzmann, H. J.: Ber. 2. Tagg. d. Forsch. Gem. Zellularther. 14–17 (1955).
– Ber. 3. Tagg. d. Forsch. Gem. Zellularther. 25 (1956).
Ogawa, K. und Nowinski, W. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99, 350–354 (1958).
Oliver, J., Bloom, F. und Mangieri, C.: J. exp. Med., 86 (1947).
Overton, J.: J. Exp. Zool., 115, 521–560 (1950); 130, 433–483 (1955).
Owen, R. D.: Science, 102, 400–401 (1945).

Pallmann, H.: Hydratation. Vjschr. Naturf. Zürich, 76,16 (1931).
Parkes, A. und Smith, A.: Recent Research in Freezing and Drying. Blackwill Scientific Publications, Oxford.
Paschkis, K. E.: Cancer Res., 18, 981–991 (1958).
Paschkis, K. E., Cantarow, A., Goddard, J. J. und Zagerman, J.: Fed. Proc., 17, 121 (1958).
Passey, R. D. und Dmochowski, L.: Brit. Med. J., 11, 1129–1134 (1950).
Pataky, Z. S., Molnar, L. und Jakob, Th.: Zbl. Chir., *2*, 2071 (1958).
Pate, J. und Saweyer, P.: Amer. J. Surg., 86, 3–13 (1953).
Paterson, P. Y.: Ann. N.Y. Acad. Sc., *73*, 811 (1958).

Patt, H. M., Straube, R. L., Tyree, E. B., Swift, M. N. und Smith, D. E.: Am. J. Physiol., *159*, 269–280 (1949).
Patt, H. M., Tyree, E. B., Straube, R. L. und Smith, D. E.: Science, *110*, 213 (1949).
Pease, D. C.: Science, 106, 543 (1947).
Peer, L. A.: Ann. N. Y. Acad. Sc., *73*, 584 (1958).
Perkinson, J. D. jr. und Irving, C. C.: Cancer Res., *16*, 496 (1956).
Perlmutter, M. und Riggs, N.: zitiert nach E. Klein.
Perutz, M. F.: Endeavour, *17*, 190 (1958).
Peter, H.: Zellulartherapie und Fluoreszenzmikroskopie.
Pfeiffer, E. F. und Merrill, I. O.: Dtsch. med. Wschr., *87*, 934 (1962).
Polge, C., Smith, A. U. und Parkes, A. S.: Nature, *164*, 666 (1949).
Porter, K. R. und Palade, G.: J. Biophys. and Biochem. Cyt., *3*, 269 (1957).
Prolingheuer, K. H. und Scholz, H.: Zschr. f. Altersforschg., *7*, 93 (1953).
Proom, H. und Hemmons, L. M.: J. Gen. Microbiol., 3, 7–18 (1949).

Quimby, E. H.: Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med., *75*, 537 (1950).

Rapport, R. L.: J. Clin. Endocrinol., *10*, 735 (1950).
Rasmussen, H.: Arch. exp. Zellforschg. XIV/2, 285 (1934).
Ratschow, M.: Grundlagen der Therapie mit Sexualhormonen in der inneren Medizin. Enke-Verlag, Stuttgart (1952).
Ray, R. D. und Holloway, J. A.: Ber. allg. u. spez. Path., *38*, 127 (1958).
Reale, E.: Monit. Zool. Ital., *63*, 197–222 (1957).
Reitz, W. und Schoop, W.: Die Medizinische, 13, 461–462 (1957).
Rekers, P. E.: Project, U. R., *11* (1948).
Rey, L.: Conservation de la vie par le froid. Ed. Hermann (1959).
– Traité de lyophilisation. Paris (1960).
Rietschel, H. G.: Med. Klin., *50*, 1823 (1955).
– Die Medizinische, 24 (1955).
– Problematik und Klinik der Zellulartherapie. Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1957).
– Münch. Med. Wschr., *35*, 1275 (1957).
– Med. Klin., *48*, 2080 (1957).
– Ärztl. Forschg. Wörishofen, *XIV*, 136 (1960).
– Dtsch. Med. J., *11* (1960).
Riley, J. F.: Experentia (Basel), 14, 141 (1958).
Riley, J. F. und West, G. B.: J. Physiol. (London), 120, 528–537 (1953).
Ritter, U.: Der Chirurg, 3, 114–118 (1956 a).
– Zbl. Chir., 6, 259–266 (1956 a).
– Langenbecks Archiv. u. dtsch. Zschr. Chir., 282, 673–679 (1955).
Rob, C.: Parkes and Smith Blackwell scientific Pub., Oxford, 292–294 (1960).

ROBERTS, S. und WHITE, A.: J. biol. Chem., 178, 151–162 (1949).
ROBERTSON, J. D.: Biochem. Soc. Symp., *16*, 3 (1959).
ROBINEAUX, R. und PINET, J.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA Foundation Symposion. I. A. Churchill, Ltd., London (1960), S. 5.
ROBINSON, A. M.: Rec. Progr. in Hormone Res., 163 (1954).
ROGERS, L. A.: J. Infect. Dis., 14, 100–123 (1914).
ROHR, A.: Inaugural-Diss., Heidelberg (1960).
ROHRBACH, P.: Inaugural-Diss., Heidelberg (1960).
ROLLHÄUSER, H.: Z. Zellforsch., 46, 52–66 (1957).
– Morph. Ib., *90*, 249 (1950).
RÖMER: Diskussionsbemerkung a. d. 5. Tagung d. Forschungskreises f. Zellulartherapie, 1. u. 2. März 1958, Heidelberg.
ROMHANYI, G.: Act. Morphol. Hung., *5*, 311 (1955).
ROSENTHAL, O., BOWIE, M. A. und WAGONER, G.: J. Cell. a. Comp. Physiol., *19*, 333 (1942).
ROSS, M. H. und ELY, J. O.: J. Franklin Inst., *258*, 63 (1954).
ROTHER: Ber. 2. Tagg. Forschg. Gem. Zellulartherapie, März 1955, S. 33.
– Ber. 3. Tagg. Forschg. Gem. Zellulartherapie, 3./4. März 1956, S. 3.
ROYO, P. E. und QUAY, W. B.: Growth, Ithaca, *23*, 313 (1959).

SAGER, C. A.: Mschr. Kinderhk., 103, 469–471 (1955).
SÄKER, G.: Münch. med. Wschr., 737 (1954).
SALMON, CH.: Rev. Franc. études Clin. et Biol., *IV*, 239–241 (1959).
SCHÄFER, P.: Virchows Arch. path. Anat., *317*, 484 (1949).
SCHEIFFARTH, F.: Dtsch. med. Wschr., *28*, 1329 (1961).
SCHENCK, V.: Ref. Blatt Die Zellulartherapie, 27, 9–12 (1960).
SCHINKEL, P. G. und FERGUSON, K. A.: J. Biol. Sci., 6, 533–546 (1953).
SCHMID, F.: Tuberkulosearzt, 5, 701 (1951).
– Beitr. Klin. Tbk., 105, 397 (1951).
– Bericht v. d. 5. Tagung d. Forschungskreises f. Zellulartherapie, 41–44 (1958).
– Kinderärztl. Praxis, Leipzig, 26, 485–493 (1958).
– Rapports du 3ème Congrès Français de Thérapeutique Cellulaire, Paris. Edit. du Centre Méd. d. études et de Rech., Paris, 3–10 (1959).
– Vorträge beim II. Intern. Kongreß f. Zell- und Histotherapie, Wiesbaden, I, 85–88 (1959).
– Rotterdamse gesprekken over celtherapie. Med. Uitgeversmaatschappij N. V., Leiden, 97–104 (1960).
– Vortrag anl. d. III. Intern. Kongresses f. Zellulartherapie, Paris 1961.
– Vortrag anl. d. 8. Arbeitstagung d. Deutschen Gesellschaft f. Zellulartherapie, 28, 1–3 (1961).
– Fortschr. Med., 80, 13 (1962).
– Mon. Kurse ärztl. Fortb., *12*, 4, 193–196 (1962).
SCHMID, F. und HAGGE, W.: Beitr. Klin. Tbk., 109, 151 (1953).
SCHMID, F. und LEWALD, H.: Mschr. Kinderheilk. (1962).

SCHMID, F., SCHUSTER, W. und KREBS, H.: Z. Kinderheilk., 71, 154 (1952).
– Kinderärztl. Praxis, 26, 485 (1958).
– Med. Klinik, 54, 1202–1206 (1959).
– Die Medizin. Welt, 19, 1207 (1960).
SCHMIDT, H.: Philosophisches Wörterbuch. Verlag A. Körner, Leipzig (1934).
– Fortschritte der Serologie. Verlag Dietrich Steinkopff, Darmstadt (1955).
– In: RIETSCHEL: Problematik und Klinik d. Zellulartherapie. Urban & Schwarzenberg (1957).
SCHNEIDER, M.: Therapiewoche, *12*, 363 (1962).
SCHNEIDER, W. C. und POTTER, V. R.: J. Biol. Chem., *149*, 217 (1943).
SCHÖNE, G.: Bruns Beitr. klin. Chir., 99, 233 (1916).
SCHRIEFERS, H.: Mediz. Welt, 1, 21 (1961).
SCHUBERT, E. v.: Ärztl. Wschr., 40/54, 953 (1954).
SCHWARZ, W.: Inaug. Diss., Jena (1949).
SCOTHORNS, R. J.: Acad. Scienc., *73*, 673 (1958).
SCOTT, G. H. und PACKER, D. M.: Anat. Rec., 74, 31–46 (1939).
SCOTT, R. B., MATTHIAS, J. Q. und andere: British Medical J. Nov., 25, 1385 (1961).
SEWELL, W. H., BATCHELOR, W. H. und KUTH, D. R.: Surg. Forum, *5*, 264–268 (1954).
SHACKELL, L. F.: Amer. J. Physiol., 24, 325–340 (1909).
SHELTON, E., SCHNEIDER, W. C. und STRIEBICH, M. J.: Exp. Cell. Res., *4*, 32 (1953).
SHERWOOD-LAWRENCE, H.: Physiol. Rev. Baltimore, *39*, 811 (1959).
– Cellular aspects of immunity. A CIBA foundation Symposion. I. A. Churchill Ltd., London (1960), S. 243.
SIMON, D.: C. r. Soc. Biol. (Paris), 151, 1576–1580 (1958).
SIMON, FR. A.: J. Allergy, S. Louis, Bd. *6*, 1 (1934).
SIMON, W. und MAYER, W. W.: Klin. Wschr., *36*, 424 (1958).
SIMONSEN, M.: La biologie des homogreffes. Coll. Internat. C.N.R.S., Paris (1957).
– Cellular aspects of Immunity. A CIBA foundation Symposion. I. A. Churchill Ltd., London (1960), S. 122.
SIMONSEN, M., ENGELBRECHT-HOLM, J., JENSEN, E. und POULSEN, H.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 73, 834–841 (1958).
SIRLIN, J. L.: Nature, 186, 275 (1960).
SISKIND, G. W. und THOMAS, L.: Biological Problems of Grafting. Blackwell, Oxford (1959), S. 176.
SJÖSTRAND, F.: Freezing and drying report of a symposium. 177–188 (1951).
SMITH, A. U.: Proc. R. Soc. Med., 47, 57 (1954).
– Biological effects of freezing and supercooling. E. Arnolds Ltd., London (1961).

SMITH, L. H., MAKINODAN, T. und CONGDON, C. C.: Cancer Res., *17*, 367–369 (1957).
SMITH, P. E. und MACDOWELL, E. C.: Anat. Rec., 46, 249–257 (1930).
SNELL, G. D.: Ann. Rev. Microbiol., 11, 439–458 (1957).
– Ann. N. Y. Acad. Sci., 69, 555–560 (1957).
– Proc. Nat. Acad. Sci., 15, 733–734 (1929).
SNYDERMANN, R. K.: Plast. Rekonstr. Surg., *19*, 41–48 (1957).
SPIELMANN, W. und SCHULTZ, W.: Z. f. Hygiene, 134, 233–267 (1952).
SPRADO, K.: Beitr. z. Zellulartherapie. Ott Verlag Thun (1952).
STAEHLER, W.: Dtsch. med. Wschr., *78*, 106 (1953).
STAFFORD, R. O. und ATKINSON, W. B.: Science, 107, 279–281 (1948).
STEENBERGHE, P. VAN: Soc. Biol., 55, 1646 (1903).
STEIN, J.: Mts. Kurse f. d, ärztl. Fortbildg., 3, 112–116 (1954).
– Mitt. Dtsch. Pharmazeut. Ges., *25*, 42–46 (1955).
– Biologisch Medizinisches Taschenjahrbuch 1955. Hippokrates-Verlag Stuttgart, *15*, 54–71 (1955).
– Pharm. Ztg., Berlin, *91–100/36*, 1014–1018 (1955).
– Fortschr. Med., *73*, 212 (1955).
– Fortschr. Med., *73*, 415–416 (1955).
– Zellulartherapie in Klinik und Praxis, KUHN, W. Hippokrates-Verlag Stuttgart, 75–90 (1956).
– Der Deutsche Apotheker, *10*, 1–2 (1958).
– Hippokrates, Stuttgart, 29, 811 (1958).
– Rapports du 1er Congrès Français de Thérapeutique Cellulaire, Paris. Edit. du Centre Méd. d'Etudes et de Rech., Paris, 72–85 (1958).
– Med. Klin., *55*, 73–78 (1960).
– Therap. Woche, 11, 495–500 (1961).
STEPANTSCHITZ, G. und SCHREINER, B.: Ber. 3. Tagg. Forsch. Gem. Zellularther. 22–24, (1956).
STEPHENSON, J. L.: In: PARKES und SMITH: Recent research in freezing and drying. Oxford (1960).
STILLE, G.: Arzneimittelforschg., *3*, 127 (1953).
STILLE, G. und WACHTER, H. P.: Z. Ges. exper. Med., *122*, 199 (1953).
STICH, H.: Experientia, *12*, 7 (1956).
STOKES, J. jr., MCGUINNESS, A. C. und MUDD, S.: Trans. Soc. Pediat. Res. Amer. J. Dis. Child., 50, 535–536 (1935).
STRUMIA, M. M., MCGRAW, J. J. und HEGGESTAD, G. E.: Amer. J. Clin. Path., 22 (no. 4), 313–321 (1952).
STURM, A.: Ber. 2. Tagg. Forsch. Gem. f. Zellulartherapie am 5./6. 3. 1955, S. 40.
– Medizinische Welt, 1637 (1955).
SUMMER, E.: Diss. TIHO, Wien (1961).
SWIFT, H. F.: J. Exper. Med., 33, 69–75 (1921).
SYLVÉN, B.: Acta Union Int. Canc., 7, 708–712 (1951 a).
– Freezing and drying. Report of a Symposium, 169–176 (1951 b).

SZYMANSKI, I. S.: Pflügers Arch., *171*, 324 (1918).

TALIAFERRO, W. H. und HUMPHREY, J. H.: Advances in Immunology, 1 (1961), Academic Press London und New York.
TAMMANN, G.: Zschr. physiol. Chem., 25, 441–479 (1898).
TATTERSAL, R. N.: J. Med., *19*, 151 (1950).
TEIR, H.: Growth, 16, 85–108 (1952).
TEIR, H. und andere: Exp. Cell. Res., 5, 500, Growth, 17, 229 (1954).
TEIR, H. und RAVANTI, K.: Exp. Cell. Res., 5, 500–507 (1953).
TELLER, H., VESTER, G. und POHL, H.: Z. Haut-Geschl. Krht., *22*, 67 (1957).
THIEL, A.: Dtsch. Med. Wschr., *84*, 2038 (1959).
THIÉRY, J. P.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA Foundation Symposion. I. A. Churchill Ltd., London (1960), S. 59.
THOMA, R.: Virch. Arch. f. path. Anat., *230*, 1 (1921).
THOMAS, E. D., LOCHTE, H. L., LU, W. C. und FERREBEE, J. W.: New England J. Med., *257*, 491–496 (1957).
TIEDEMANN, H.: Virchows Arch. path. Anat., *317*, 461 (1949).
TIEDGE, TH.: Med. Monatsschr., 386 (1955).
TOBIOKA, M. und BIESELE, J. J.: J. biophys. biochem. Cytol., *2*, 319 (1956).
TOWNES, P. L. und HOLTFRETER, J.: J. Exp. Zool., 128, 53–120 (1955).
TREADWELL, A. DE G., GARDNER, W. V. und LAWRENCE, J. H.: Endocrinology, *32*, 161–164 (1943).
TSCHABRUN, M.: Diss. TIHO, Wien (1959).
TUCKER, R. G. und KEYS, A.: J. Clin. Invest., *30*, 869 (1951).
TUMANISCHVILI, G. D., JANDIERI, K. M. und SVANIDZE, I. K.: Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 10, 1107–1109 (1956).

UHLENBRUCK, P.: Therapiewoche, 5/6, 104–106 (1955).
ULLRICH, K.: Arbeitstagung d. Sekt. Kleintierkrankheiten d. Deutschen Vet. Med. Ges. München (11. u. 12. 10. 1958).
UPHOFF, D. E.: J. Nat. Cancer Inst., *20*, 625 (1958).

VERZÁR, F.: Helvet. physiol. acta, *14*, 207 (1956).
VERZÁR, F. und FREYDBERG, V.: J. Gerontol., *11*, 63 (1956).
VOISIN, GUY, A. und TOULLET, FR.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA Foundation Symposion. I. A. Churchill Ltd., London (1960), S. 398.
VORLAENDER, K. O.: Sonderdruck: Erg. d. med. Grundlagenforschg. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 401.
VORLAENDER, K. O., FITTING, W. und GIERLICH, G.: Med. Klin., 21 (1955).
VOS, O.: Ned. Tijdschr. v. Geneesk., *102*, 2004–2012 (1958).
VOS, O. und BEKKUM, D. W. VAN: Ned. Tijdschr. v. Geneesk., *100*, 3788–3798 (1956).

Vos, O., Davids, J. A. G., Weyzen, W. W. H. und Bekkum, D. W. van: Acta physiol. pharm. neerl., *4*, 482–486 (1956)
Vries, M. J. de: Ned. Tijdschr. v. Geneesk., *102*, 2012–2018 (1958).

Wagner, G.: Dtsch. Med. Wschr., *82*, 1427 (1957).
Waksman, B. H.: Cellular aspects of Immunity. A CIBA foundation Symposion I. A. Churchill Ltd., London (1960), S. 280.
Walter, H., Allman, D. W. und Mahler, H. R.: Science, 124, 1251–1252 (1956).
Warren, J. M.: Brit. J. anim. Behav., *5*, 90 (1957).
Webster, J. P.: Ann. Surg., 431–439 (1944).
Weigle, W. O.: Adv. Immunol., *1*, 283 (1961).
Weinbach, E. C. und Garbus, J.: Narue, *178*, 1225 (1956).
Weiss, P.: Quart. Rev. Biol., 25, 177–198 (1950).
– Biological specificity and growth, u. E. G. Butler ed. Princeton University Press (1955).
Weiss, P. und Andres, G.: J. Exp. Zool., 121, 449–488 (1952).
Weiss, P. und Taylor, A. C.: Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 1177–1185 (No. 8) (1960).
Weiss, P. und Wang, H.: Anat. Rec., 79, 62 (1941).
Weissenfels, N.: Z. Naturforschg., *13*, 182 (1958).
Wenzel, H. G.: Virch. Arch. path. Anat., *317*, 677 (1950).
Werner, S. C.: The Thyroid, a fundamental and clinical Text. 2nd Printing Hoeber-Harper, New York (1957).
Wiesenhüter, E.: Nervenarzt, *3*, 121 (1954).
Willemer, H.: Vortr. 3. Tagg. über Gefriertrocknung 9. 5. 1956. Ref. in: Chemie-Ingenieur-Technik 29, 267–275 (1957).
Williams, R. C.: J. Exp. Cell. Res., 4, 188–201 (1953).
– Biochim. Biophys. Acta, 9, 237–239 (1952).
Willier, B. H.: Am. J. Anat., 33, 67–103 (1924).
Wilson, J. W. und Leduc, E. H.: Anat. Rec., 97, 571–593 (1945).
Witte, S.: Blut, *6*, 432 (1960).
– Dtsch. Med. Wschr., *86*, 28, 1334–1337 (1961).
Witte, S., Schricker, K. Th. und Maurer, W.: Münch. Med. Wschr., *102*, 25, 1251–1253 (1960).
Wollaston, W. H.: Philos. Transact. Roy. Soc. London, 103, 71–74 (1813).
Wood, T. H. und Rosenberg, A. M.: Biochim. biophys. Acta, *25*, 78–87 (1957).
Woodruff, M. F. A.: La Biologie des Homogreffes. Centre Nationale de la Rech. Scientifique Paris (1957), S. 261.
– Ann. New York Acad. Scienc., *72*, 792 (1957).
Wrba, H.: Naturwiss., 49, 97–101 (1962, 1).
– Pathol.-Biol., 9, 581–583 (1961, 2).
Wrba, H. und Kalb, H. W.: Naturwiss., 47, 85–86 (1960).

Wurmser, R.: Rev. Hémat., 9, 291 (1954).
Wykoff, R. W.: Z. wiss. Mikrosk., 62, 87–91 (1954).
– Science, 104, 36–37 (1946).
Yorkoyama, H. O. und Stowell, R. E.: J. Nat. Canc. Inst., 12, 211–213 (1951).

Sachregister

D

F

G

I

K

L

N

O

P

T

Z